

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

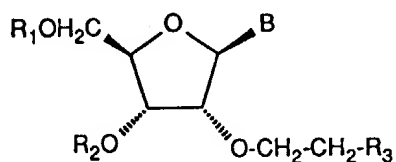
Office européen des brevets

(11) Veröffentlichungsnummer : **0 679 657 A2**

(12)

**EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**(21) Anmeldenummer : **95810259.2**(51) Int. Cl.<sup>6</sup> : **C07H 19/067, C07H 19/167,  
C07H 21/00, C12Q 1/68,  
A61K 31/70**(22) Anmeldetag : **19.04.95**(30) Priorität : **27.04.94 CH 1307/94**(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung :  
**02.11.95 Patentblatt 95/44**(84) Benannte Vertragsstaaten :  
**AT BE CH DE DK ES FR GB IE IT LI LU NL PT  
SE**(71) Anmelder : **CIBA-GEIGY AG  
Klybeckstrasse 141  
CH-4002 Basel (CH)**(72) Erfinder : **Martin, Pierre, Dr.  
Meisenweg 38  
CH-4310 Rheinfelden (CH)**(54) **Nukleoside und Oligonukleotide mit 2'-Ethergruppen.**

(57) Es werden Verbindungen der Formel



beschrieben, worin  $R_1$  und  $R_2$  unabhängig voneinander für Wasserstoff oder eine Schutzgruppe stehen oder  $R_1$  diese Bedeutungen hat und  $R_2$  für einen eine phosphorhaltige Nukleotid-Brückengruppe bildenden Rest steht ; B einen Purin- oder Pyrimidinrest oder ein Analoges davon bedeutet ; und  $R_3$  für OH, F oder  $(CF_2)_nCF_3$  steht, worin n eine Zahl von 0 bis 7 bedeutet, und Oligonukleotide, die diese Nukleoside enthalten.

EP 0 679 657 A2

ATTORNEY DOCKET NUMBER: 7991-086-99

SERIAL NUMBER: 09/685,403

REFERENCE: BI



⑪ Veröffentlichungsnummer : **0 679 657 A2**

⑫ **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

⑰ Anmeldenummer : **95810259.2**

⑤① Int. Cl.<sup>6</sup> : **C07H 19/067, C07H 19/167,  
C07H 21/00, C12Q 1/68,  
A61K 31/70**

⑲ Anmeldetag : **19.04.95**

③① Priorität : **27.04.94 CH 1307/94**

④③ Veröffentlichungstag der Anmeldung :  
**02.11.95 Patentblatt 95/44**

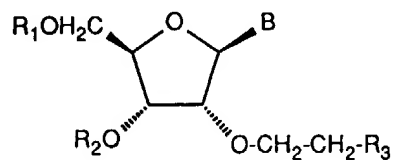
⑥④ Benannte Vertragsstaaten :  
**AT BE CH DE DK ES FR GB IE IT LI LU NL PT  
SE**

⑦① Anmelder : **CIBA-GEIGY AG**  
**Klybeckstrasse 141**  
**CH-4002 Basel (CH)**

⑦② Erfinder : **Martin, Pierre, Dr.**  
**Meisenweg 38**  
**CH-4310 Rheinfelden (CH)**

⑤④ **Nukleoside und Oligonukleotide mit 2'-Ethergruppen.**

⑤⑦ Es werden Verbindungen der Formel



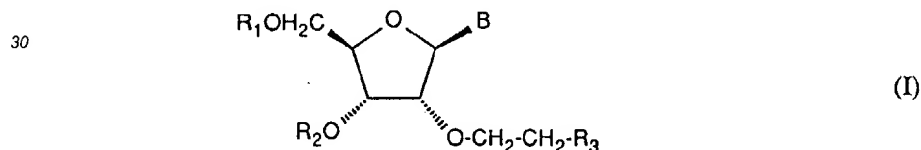
beschrieben, worin  $R_1$  und  $R_2$  unabhängig voneinander für Wasserstoff oder eine Schutzgruppe stehen oder  $R_1$  diese Bedeutungen hat und  $R_2$  für einen eine phosphorhaltige Nukleotid-Brückengruppe bildenden Rest steht; B einen Purin- oder Pyrimidinrest oder ein Analoges davon bedeutet; und  $R_3$  für OH, F oder  $(CF_2)_nCF_3$  steht, worin n eine Zahl von 0 bis 7 bedeutet, und Oligonukleotide, die diese Nukleoside enthalten.

**EP 0 679 657 A2**

Die Erfindung betrifft Ribo-Nukleosidanaloge, deren 2'-OH Gruppe mit Hydroxyethyl- oder Fluoralkylgruppen verethert ist, ein Verfahren zu deren Herstellung, Oligonukleotide mit diesen Nukleosiden und die Verwendung der Nukleoside zur Herstellung von Oligonukleotiden mit gleichen oder verschiedenen Nukleosideinheiten im Molekül.

5 Nukleoside und Oligonukleotide haben als antivirale Wirkstoffe bzw. wegen ihrer Fähigkeit zur Wechselwirkung mit Nukleinsäuren ("Antisense"-Oligonukleotide) und der damit verbundenen biologischen Aktivität breites Interesse gefunden, siehe zum Beispiel Uhlmann, E., Peyman, A., Chemical Reviews 90:543-584 (1990). Zur Bereitstellung von Nukleosiden mit neuen Eigenschaften oder zur Verbesserung der Wechselwirkung von Antisense-Oligonukleotiden mit natürlichen Nukleinsäuren sowie ihrer Stabilität gegenüber Nukleasen sind die Zuckerreste von Nukleosiden (bzw. der Nukleotideinheiten in Oligonukleotiden), oder die internukleotidische Phosphatbindung in Oligonukleotiden in unterschiedlichster Weise modifiziert worden, siehe zum Beispiel Marquez, V.E., Lim, M.I., Medicinal Research Reviews 6:1-40 (1986), Hélène, C., Toulmé, J.J., Biochimica et Biophysica Acta 1049:99-125 (1990), Englisch, U., Gauss, D.H., Angewandte Chemie 103:629-646 (1991), Matteucci, M.D., Bischofberger, N., Annual Reports in Medicinal Chemistry 26:87-296 (1991). In Cook, P.D., Anti-Cancer Drug Design 6:585-607 (1991) und WO 91/06556 werden Nukleoside beschrieben, die an der 2'-OH-Gruppe des Zuckers modifiziert sind. Die beschriebenen Modifikationen führen zu erhöhter Nukleaseresistenz; je länger der Alkylrest wird, umso höher wird die Nukleaseresistenz. Dabei wird mit kleinen Alkylresten wie Methyl, Ethyl oder Propyl eine schwache Erhöhung der Bindungsaffinität beobachtet, bei längeren Ketten sinkt die Bindungsaffinität aber drastisch ab. Nukleoside mit Hydroxyethyl- oder Fluoralkylgruppen als Seitenketten an der 2'-OH Gruppe wurden bis anhin nie in Oligonukleotide eingebaut. Überraschenderweise erhöhen die erfindungsgemässen Modifikationen die Bindungsaffinität zur komplementären RNA gegenüber gleich langen unsubstituierten Alkylketten. Dieses Ergebnis war aufgrund der publizierten Daten nicht zu erwarten. In Analogie zu den 2'-OH-modifizierten Oligoribonukleotiden zeichnen sich die erfindungsgemässen Verbindungen ebenfalls durch eine markante Nukleaseresistenz aus. Zusätzlich weisen Oligonukleotide, welche die erfindungsgemässen Nukleoside enthalten, eine erhöhte zelluläre Aufnahme auf und verfügen demzufolge über eine verbesserte Bio-Verfügbarkeit und Aktivität in vivo.

Ein Gegenstand der Erfindung sind Verbindungen der Formel I



worin  $R_1$  und  $R_2$  unabhängig voneinander für Wasserstoff oder eine Schutzgruppe stehen oder  $R_1$  diese Bedeutungen hat und  $R_2$  für einen eine phosphorhaltige Nukleotid-Brückengruppe bildenden Rest steht; B einen Purin- oder Pyrimidinrest oder ein Analoges davon bedeutet; und  $R_3$  für OH, F oder  $(CF_2)_nCF_3$  steht, worin n eine Zahl von 0 bis 7 bedeutet.

40 Wenn  $R_3$  OH bedeutet, kann diese Hydroxygruppe mit einer Gruppe wie für  $R_1$  und  $R_2$  definiert geschützt sein.

In einer bevorzugten Ausführungsform steht n für die Zahl 0.

In einer bevorzugten Ausführungsform stellen  $R_1$  und  $R_2$  Wasserstoff dar.

Schutzgruppen und Verfahren zur Derivatisierung der Hydroxylgruppen mit solchen Schutzgruppen sind 45 in der Zucker- und Nukleotidchemie allgemein bekannt und zum Beispiel von Greene, B.T., Protective Groups in Organic Synthesis, Wiley Interscience, New York (1991), von Sonveaux, E., Bioorganic Chemistry 14:274-325 (1986) oder von Beaucage, S.L., Iyer, R., Tetrahedron 48:2223-2311 (1992) beschrieben. Beispiele für solche Schutzgruppen sind: Benzyl, Methylbenzyl, Dimethylbenzyl, Methoxybenzyl, Dimethoxybenzyl, Brombenzyl, 2,4-Dichlorbenzyl; Diphenylmethyl, Di(methylphenyl)methyl, Di(dimethylphenyl)methyl, Di(methoxyphenyl)methyl, Di(dimethoxyphenyl)methyl, Triphenylmethyl, Tris-4,4'-tert.butylphenylmethyl, Di-p-anisylphenylmethyl, Tri(methylphenyl)methyl, Tri(dimethylphenyl)methyl, Methoxyphenyl(diphenyl)methyl, Di(methoxyphenyl)phenylmethyl, Tri(methoxyphenyl)methyl, Tri(dimethoxyphenyl)methyl; Triphenylsilyl, Alkyldiphenylsilyl, Dialkylphenylsilyl und Trialkylsilyl mit 1 bis 20, bevorzugt 1 bis 12 und besonders bevorzugt 1 bis 8 C-Atomen in den Alkylgruppen, zum Beispiel Trimethylsilyl, Triethylsilyl, Tri-n-propylsilyl, i-Propyl-dimethylsilyl, t-Butyl-dimethylsilyl, t-Butyl-diphenylsilyl, n-Octyl-dimethylsilyl, (1,1,2,2-Tetramethylethyl)-dimethylsilyl;  $-(C_1-C_8-Alkyl)_2Si-O-Si(C_1-C_8-Alkyl)_2-$ , worin Alkyl zum Beispiel Methyl, Ethyl n- und i-Propyl, n-, i- oder t-Butyl bedeutet;  $C_2-C_{12}$ -, besonders  $C_2-C_8$ -Acyl, wie zum Beispiel Acetyl, Propanoyl, Butanoyl, Pentanoyl, Hexanoyl, Benzoyl, Methylbenzoyl, Methoxybenzoyl, Chlorbenzoyl und Brombenzoyl;  $R_{S1}-SO_2-$ , worin  $R_{S1}$   $C_1-C_{12}$ -Alkyl, besonders

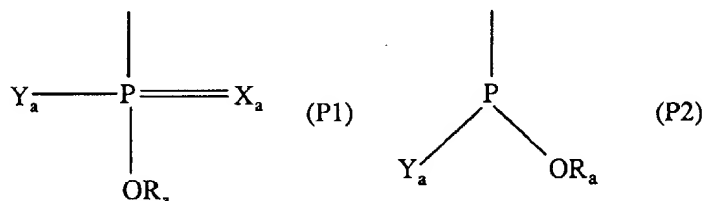
C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl, C<sub>5</sub>- oder C<sub>6</sub>-Cycloalkyl, Phenyl, Benzyl, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>- und besonders C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkylphenyl, oder C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>- und besonders C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkylbenzyl, oder Halogenphenyl oder Halogenbenzyl bedeutet, zum Beispiel Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Butyl-, Phenyl-, Benzyl-, p-Brom-, p-Methoxy- und p-Methylphenylsulfonyl; unsubstituiertes oder mit F, Cl, Br, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkoxy, Tri-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl)silyl oder C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkylsulfonyl substituiertes C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-, bevorzugt C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkoxy-carbonyl, zum Beispiel Methoxy-, Ethoxy-, n- oder i-Propoxy- oder n-, i- oder t-Butoxy-carbonyl, 2-Trimethylsilylethoxy-carbonyl, 2-Methylsulfonylethoxy-carbonyl, Allyloxy-carbonyl oder unsubstituiertes oder wie für Alkoxy-carbonyl substituiertes Phenyloxy-carbonyl oder Benzyloxy-carbonyl, zum Beispiel Methyl- oder Methoxy- oder Chlorphenyloxy-carbonyl oder -benzyloxy-carbonyl, sowie 9-Fluorenylmethyloxy-carbonyl. Sofern R<sub>1</sub> und/oder R<sub>2</sub> Alkyl bedeuten, kann es mit F, Cl, Br, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkoxy, Phenyloxy, Chlorphenyloxy, Methoxyphenyloxy, Benzyloxy, Methoxybenzyloxy oder Chlorphenyloxy substituiert sein. Bei R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> in Formel I kann es sich um gleiche oder verschiedene Schutzgruppen handeln.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform stellen R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> als Schutzgruppen Benzyl, Methylbenzyl, Dimethylbenzyl, Methoxybenzyl, Dimethoxybenzyl, halogeniertes Benzyl, insbesondere Brombenzyl; Diphenylmethyl, Di(methylphenyl)methyl, Di(dimethylphenyl)methyl, Di(methoxyphenyl)methyl, Di(methoxyphenyl)(phenyl)methyl, Triphenylmethyl, Tris-4,4',4''-tert.butylphenylmethyl, Di-p-anisylphenylmethyl, Tri(methylphenyl)methyl, Tri(dimethylphenyl)methyl, Tri(methoxyphenyl)methyl, Tri(dimethoxyphenyl)methyl; Trimethylsilyl, Triethylsilyl, Tri-n-propylsilyl, i-Propyl-dimethylsilyl, t-Butyl-dimethylsilyl, t-Butyl-diphenylsilyl, n-Octyl-dimethylsilyl, (1,1,2,2-Tetramethylethyl)-dimethylsilyl, -(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si-O-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-, -(i-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sub>2</sub>Si-O-Si(i-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sub>2</sub>-; Acetyl, Propanoyl, Butanoyl, Pentanoyl, Hexanoyl, Benzoyl, Methylbenzoyl, Methoxybenzoyl, Chlorbenzoyl und Brombenzoyl; Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Butyl-, Phenyl-, Benzyl-, p-Brom-, p-Methoxy- und p-Methylphenylsulfonyl; Methoxy-, Ethoxy-, n- oder i-Propoxy- oder n-, i- oder t-Butoxy-carbonyl, oder Phenyloxy-carbonyl, Benzyloxy-carbonyl, Methyl- oder Methoxy- oder Chlorphenyloxy-carbonyl oder -benzyloxy-carbonyl oder 9-Fluorenylmethyloxy-carbonyl dar.

R<sub>2</sub> kann als phosphorhaltiger eine Nukleotid-Brückengruppe bildender Rest der Formel P1 oder P2

25

30



entsprechen, worin Y<sub>a</sub> Wasserstoff, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-Alkyl, C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>-Aryl, C<sub>7</sub>-C<sub>20</sub>-Aralkyl, C<sub>7</sub>-C<sub>20</sub>-Alkaryl, -OR<sub>b</sub>, -SR<sub>b</sub>, -NH<sub>2</sub>, Primäramino, Sekundäramino, O<sup>⊖</sup>M<sup>⊕</sup> oder S<sup>⊖</sup>M<sup>⊕</sup> darstellt; X<sub>a</sub> Sauerstoff oder Schwefel bedeutet; R<sub>a</sub> Wasserstoff, M<sup>⊕</sup>, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-Alkyl, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-Alkenyl, C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>-Aryl, oder die Gruppe R<sub>a</sub>O- für N-Heteroaryl-N-yl mit 5 Ringgliedern und 1 bis 3 N-Atomen steht; R<sub>b</sub> Wasserstoff, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-Alkyl oder C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>-Aryl bedeutet; und M<sup>⊕</sup> für Na<sup>⊕</sup>, K<sup>⊕</sup>, Li<sup>⊕</sup>, NH<sub>4</sub><sup>⊕</sup> steht oder Primär-, Sekundär-, Tertiär- oder Quartärammonium darstellt; wobei Alkyl, Aryl, Aralkyl und Alkaryl in Y<sub>a</sub>, R<sub>a</sub> und R<sub>b</sub> unsubstituiert oder mit Alkoxy, Alkylthio, Halogen, -CN, -NO<sub>2</sub>, Phenyl, Nitrophenyl, oder Halogenphenyl substituiert ist.

Y<sub>a</sub> enthält als Primäramino bevorzugt 1 bis 12 und besonders bevorzugt 1 bis 6 C-Atome, und als Sekundäramino bevorzugt 2 bis 12 und besonders bevorzugt 2 bis 6 C-Atome.

Bei dem Primäramino und Sekundäramino kann es sich zum Beispiel um Reste der Formel R<sub>c</sub>R<sub>d</sub>N handeln, worin R<sub>c</sub> für H steht oder unabhängig die Bedeutung von R<sub>d</sub> hat, und R<sub>d</sub> C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-, bevorzugt C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>- und besonders bevorzugt C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-, bevorzugt C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>- und besonders bevorzugt C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Aminoalkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-, bevorzugt C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>- und besonders bevorzugt C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Hydroxyalkyl; Carboxyalkyl oder Carbalkoxyalkyl, wobei die Carbalkoxygruppe 2 bis 8 C-Atome enthält und die Alkylgruppe 1 bis 6, bevorzugt 1 bis 4 C-Atome; C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-, bevorzugt C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>- und besonders bevorzugt C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-Alkenyl; Phenyl, Mono- oder Di-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl- oder -Alkoxy)phenyl, Benzyl, Mono- oder Di-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl- oder -Alkoxy)benzyl; oder 1,2-, 1,3- oder 1,4-Imidazoly-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl darstellt, oder R<sub>c</sub> und R<sub>d</sub> zusammen Tetra- oder Pentamethylen, 3-Oxa-1,5-pentyl, -CH<sub>2</sub>-NR<sub>e</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- oder -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NR<sub>e</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- darstellen, worin R<sub>e</sub> für H oder C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl steht. Die Aminogruppe im Aminoalkyl kann mit ein oder zwei C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl oder -Hydroxyalkylgruppen substituiert sein. Die Hydroxylgruppe im Hydroxyalkyl kann mit C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl verethert sein.

Unter Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärammonium ist für Y<sub>a</sub> im Zusammenhang mit der Definition von M<sup>⊕</sup> ein Ion der Formel R<sub>f</sub>R<sub>g</sub>R<sub>h</sub>R<sub>i</sub>N<sup>⊕</sup> zu verstehen, bei dem R<sub>f</sub> C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-, bevorzugt C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>- und besonders bevorzugt C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl, -Aminoalkyl, -Hydroxyalkyl; Carboxyalkyl oder Carbalkoxyalkyl, wobei die Carbalkoxygruppe 2 bis 8 C-Atome enthält und die Alkylgruppe 1 bis 6, bevorzugt 1 bis 4 C-Atome; C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-,

bevorzugt C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>- und besonders bevorzugt C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-Alkenyl; Phenyl, Mono- oder Di-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl- oder -Alkoxy)phenyl, Benzyl, Mono- oder Di-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl- oder -Alkoxy)benzyl; oder 1,2-, 1,3- oder 1,4-Imidazolyl-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl darstellt, und R<sub>g</sub>, R<sub>h</sub> und R<sub>i</sub> unabhängig voneinander Wasserstoff sind oder die Bedeutung von R<sub>f</sub> haben, oder R<sub>f</sub> und R<sub>g</sub> zusammen Tetra- oder Pentamethylen, 3-Oxa-1,5-pentyl, -CH<sub>2</sub>-NR<sub>e</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- oder -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NR<sub>e</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- darstellen, worin R<sub>e</sub> für H oder C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl steht, und R<sub>h</sub> und R<sub>i</sub> unabhängig voneinander die Bedeutung von R<sub>f</sub> haben. Die Aminogruppe im Aminoalkyl kann mit ein oder zwei C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl oder -Hydroxyalkylgruppen substituiert sein. Die Hydroxylgruppe im Hydroxyalkyl kann mit C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl verethert sein.

Beispiele für Carboxyalkyl sind Carboxymethyl, Carboxyethyl, Carboxypropyl und Carboxybutyl, und Beispiele für Carbalkoxyalkyl sind diese mit Methyl oder Ethyl veresterten Carboxyalkylgruppen. Beispiele für Alkenyl sind Allyl, But-1-en-3-yl oder -4-yl, Pent-3- oder 4-en-1-yl oder -2-yl, Hex-3- oder 4- oder -5-en-1-yl oder -2-yl. Beispiele für Alkyl- und Alkoxyphenyl beziehungsweise -benzyl sind Methylphenyl, Dimethylphenyl, Ethylphenyl, Diethylphenyl, Methylbenzyl, Dimethylbenzyl, Ethylbenzyl, Diethylbenzyl, Methoxyphenyl, Dimethoxyphenyl, Ethoxyphenyl, Diethoxyphenyl, Methoxybenzyl, Dimethoxybenzyl, Ethoxybenzyl, Diethoxybenzyl. Beispiele für Imidazolylalkyl, in dem die Alkylgruppe bevorzugt 2 bis 4 C-Atome enthält, sind 1,2-, 1,3- oder 1,4-Imidazolethyl oder -n-propyl oder -n-butyl. R<sub>1g</sub> stellt bevorzugt H, Methyl oder Ethyl dar.

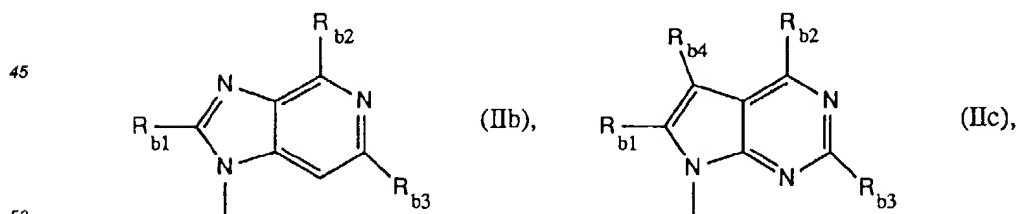
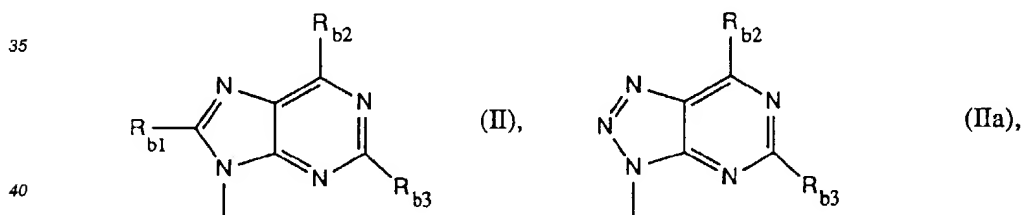
Bevorzugte Beispiele für Primäramino und Sekundäramino sind Methyl-, Ethyl-, Dimethyl-, Diethyl-, Di-i-Propyl-, Mono- oder Di-(1-hydroxy-eth-2-yl)-, Phenyl- und Benzylamino, Acetylamino und Benzoylamino sowie Piperidinyl, Piperazinyl und Morpholinyl.

Bevorzugte Beispiele für Primär- und Sekundärammonium sind Methyl-, Ethyl-, Dimethyl-, Diethyl-, Di-i-Propyl-, Mono- oder Di-(1-hydroxy-eth-2-yl)-, Phenyl- und Benzylammonium.

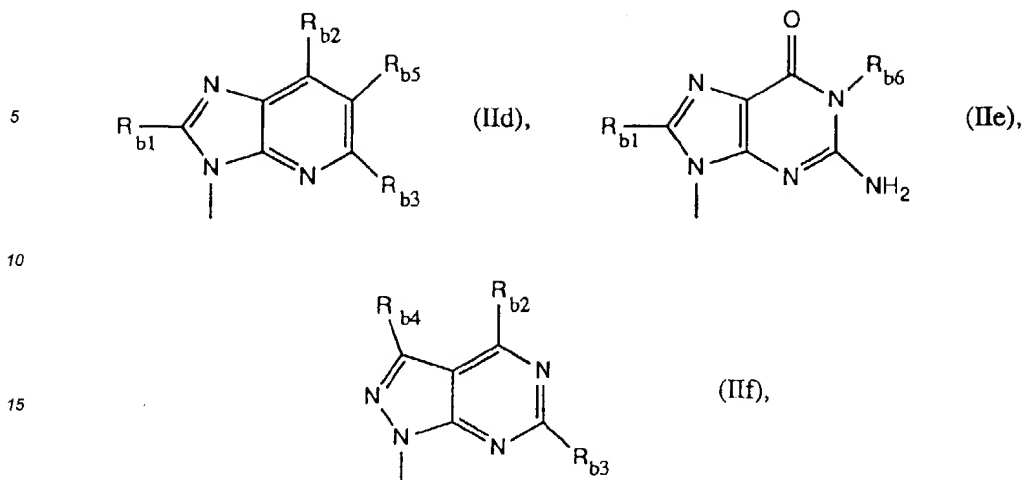
Beispiele für Y<sub>a</sub>, R<sub>a</sub> und R<sub>b</sub> als Alkyl sind Methyl, Ethyl und die Isomeren von Propyl, Butyl, Pentyl, Hexyl, Heptyl und Octyl; Beispiele für Y<sub>a</sub>, R<sub>a</sub> und R<sub>b</sub> als Aryl sind Phenyl und Naphthyl; Beispiele für R<sub>a</sub> als Alkenyl sind Allyl und (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl)CH=CH-CH<sub>2</sub>-; Beispiele für Y<sub>a</sub> als Aralkyl sind Phenyl-C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub>- mit n gleich einer Zahl von 1 bis 6, besonders Benzyl; Beispiele für Y<sub>a</sub> als Alkaryl sind Mono-, Di- und Tri(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-alkyl)phenyl. Bevorzugte Substituenten sind Chlor, Brom, Methoxy, -NO<sub>2</sub>, -CN, 2,4-Dichlorphenyl und 4-Nitrophenyl. Beispiele für R<sub>b</sub> sind 2,2,2-Trichlorethyl, 4-Chlorphenyl, 2-Chlorphenyl und 2,4-Dichlorphenyl; und Beispiele für R<sub>b</sub>O- als N-Heteroaryl sind Pyrrol-N-yl, Triazol-N-yl und Benzotriazol-N-yl.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bedeutet R<sub>a</sub> β-Cyanoethyl und stellt Y<sub>a</sub> Di(i-propylamino) dar.

Wenn B einen Purinrest oder ein Analoges davon darstellt, so kann es sich um einen Rest der Formel II, IIa, IIb, IIc, IId, IIe oder IIf handeln,



55



20 worin  $R_{b1}$  für H, Cl, Br, OH oder  $-O-C_1-C_{12}$ -Alkyl steht, und  $R_{b2}$ ,  $R_{b3}$  und  $R_{b5}$  unabhängig voneinander H, OH, SH,  $NH_2$ ,  $NHNH_2$ ,  $NHOH$ ,  $NHO-C_1-C_{12}$ -Alkyl,  $-N=CH-N(C_1-C_{12}-Alkyl)_2$ ,  $-N=CH$ -Azacycloalkyl, F, Cl, Br,  $C_1-C_{12}$ -Alkyl, Hydroxy- $C_1-C_{12}$ -alkyl, Amino- $C_1-C_{12}$ -alkyl,  $C_1-C_{12}$ -Alkoxy, Benzyloxy,  $C_1-C_{12}$ -Alkylthio, wobei die Hydroxyl- und Aminogruppen unsubstituiert oder mit einer Schutzgruppe substituiert sind, Phenyl, Benzyl, Primäramino mit 1 bis 20 C-Atomen oder Sekundäramino mit 2 bis 30 C-Atomen bedeuten,  $R_{b4}$  Wasserstoff, CN oder  $-C\equiv C-R_{b7}$ ,  $R_{b6}$  und  $R_{b7}$  Wasserstoff oder  $C_1-C_4$ -Alkyl darstellen.

25 Geeignete Schutzgruppen sind zuvor erwähnt worden. Bevorzugte Schutzgruppen sind  $C_1-C_8$ -Acylgruppen, wie zum Beispiel Acetyl, Propionyl, Butyryl und Benzoyl.  $R_{b8}$  steht bevorzugt für H oder Methyl.

Das Primäramino enthält bevorzugt 1 bis 12 und besonders bevorzugt 1 bis 6 C-Atome, und das Sekundäramino bevorzugt 2 bis 12 und besonders bevorzugt 2 bis 6 C-Atome.

30 Einige Beispiele für Alkyl, Alkoxy, Alkylthio, Hydroxyalkyl und Aminoalkyl, die bevorzugt 1 bis 6 C-Atome enthalten, sind Methyl, Ethyl und die Isomeren von Propyl, Butyl, Pentyl, Hexyl, Heptyl, Octyl, Nonyl, Decyl, Undecyl und Dodecyl, sowie entsprechende Alkoxy-, Alkylthio-, Hydroxyalkyl- und Aminoalkylreste. Das Alkyl, Alkoxy, Alkylthio, Hydroxyalkyl und Aminoalkyl enthält besonders bevorzugt 1 bis 4 C-Atome. Bevorzugte Alkyl-, Alkoxy-, Alkylthio-, Hydroxyalkyl- und Aminoalkylreste sind Methyl, Ethyl, n- und i-Propyl, n-, i- und t-Butyl, Methoxy, Ethoxy, Methylthio und Ethylthio, Aminomethyl, Aminoethyl, Hydroxymethyl und Hydroxyethyl.

35 Bei dem Primäramino und Sekundäramino kann es sich zum Beispiel um Reste der Formel  $R_{a1}R_{a2}N$  handeln, worin  $R_{a1}$  für H steht oder unabhängig die Bedeutung von  $R_{a2}$  hat, und  $R_{a2}$   $C_1-C_{20}$ -, bevorzugt  $C_1-C_{12}$ - und besonders bevorzugt  $C_1-C_6$ -Alkyl, -Aminoalkyl, -Hydroxyalkyl; Carboxyalkyl oder Carbalkoxyalkyl, wobei die Carbalkoxygruppe 2 bis 8 C-Atome enthält und die Alkylgruppe 1 bis 6, bevorzugt 1 bis 4 C-Atome;  $C_2-C_{20}$ -, bevorzugt  $C_2-C_{12}$ - und besonders bevorzugt  $C_2-C_6$ -Alkenyl; Phenyl, Mono- oder Di- $(C_1-C_4$ -Alkyl- oder -Alkoxy)phenyl, Benzyl, Mono- oder Di- $(C_1-C_4$ -Alkyl- oder -Alkoxy)benzyl; oder 1,2-, 1,3- oder 1,4-Imidazolyl- $C_1-C_6$ -Alkyl darstellt, oder  $R_{a1}$  und  $R_{a2}$  zusammen Tetra- oder Pentamethylen, 3-Oxa-1,5-pentyl,  $-CH_2-NR_{a3}-CH_2CH_2-$  oder  $-CH_2CH_2-NR_{a3}-CH_2CH_2-$  darstellen, worin  $R_{a3}$  für H oder  $C_1-C_4$ -Alkyl steht. Die Aminogruppe im Aminoalkyl kann mit ein oder zwei  $C_1-C_4$ -Alkyl oder -Hydroxyalkylgruppen substituiert sein. Die Hydroxylgruppe im Hydroxyalkyl kann mit  $C_1-C_4$ -Alkyl verethert sein.

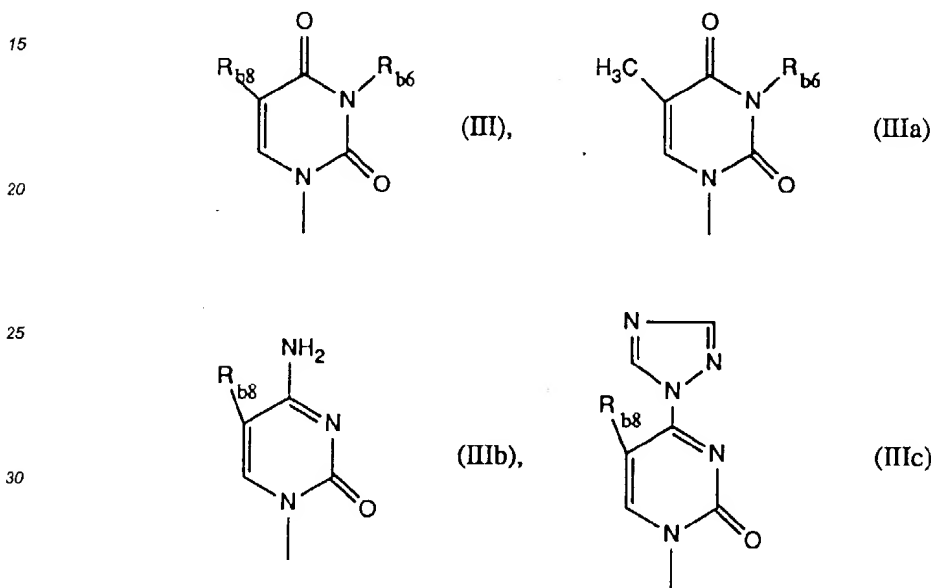
45 Beispiele für Alkyl sind zuvor angegeben worden. Beispiele für Aminoalkyl sind Aminomethyl, Aminoethyl, 1-Aminoprop-2-yl oder -3-yl, 1-Amino-but-2-yl oder -3-yl oder -4-yl, N-Methyl- oder N,N-Dimethyl- oder N-Ethyl- oder N,N-Diethyl- oder N-2-Hydroxyethyl- oder N,N-Di-2-hydroxyethylaminomethyl oder -aminoethyl oder -aminopropyl oder -aminobutyl. Beispiele für Hydroxyalkyl sind Hydroxymethyl, 1-Hydroxy-eth-2-yl, 1-Hydroxy-prop-2- oder -3-yl, 1-Hydroxy-but-2-yl, -3-yl oder -4-yl. Beispiele für Carboxyalkyl sind Carboxymethyl, Carboxyethyl, Carboxypropyl und Carboxybutyl, und Beispiele für Carbalkoxyalkyl sind diese mit Methyl oder Ethyl veresterten Carboxyalkylgruppen. Beispiele für Alkenyl sind Allyl, But-1-en-3-yl oder -4-yl, Pent-3- oder 4-en-1-yl oder -2-yl, Hex-3- oder -4- oder -5-en-1-yl oder -2-yl. Beispiele für Alkyl- und Alkoxyphenyl beziehungsweise -benzyl sind Methylphenyl, Dimethylphenyl, Ethylphenyl, Diethylphenyl, Methylbenzyl, Dimethylbenzyl, Ethylbenzyl, Diethylbenzyl, Methoxyphenyl, Dimethoxyphenyl, Ethoxyphenyl, Diethoxyphenyl, Methoxybenzyl, Dimethoxybenzyl, Ethoxybenzyl, Diethoxybenzyl. Beispiele für Imidazolylalkyl, in dem die Alkylgruppe bevorzugt 2 bis 4 C-Atome enthält, sind 1,2-, 1,3- oder 1,4-Imidazolethyl oder -n-propyl oder -n-butyl.  $R_{a3}$  stellt bevorzugt H, Methyl oder Ethyl dar.

Bevorzugte Beispiele für Primäramino und Sekundäramino sind Methyl-, Ethyl-, Dimethyl-, Diethyl-, Allyl-, Mono- oder Di-(1-hydroxy-eth-2-yl)-, Phenyl- und Benzylamino, Acetylamino, Isobutyrylamino und Benzoylamino.

In einer bevorzugten Ausführungsform stellt  $R_{b1}$  Wasserstoff dar. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform stellt  $R_{b5}$  Wasserstoff dar. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform bedeuten  $R_{b2}$  und  $R_{b3}$  unabhängig voneinander H, F, Cl, Br, OH, SH,  $NH_2$ , NHOH,  $NHNH_2$ , Methylamino, Dimethylamino, Benzoylamino, Isobutyrylamino, Methoxy, Ethoxy und Methylthio.

Einige Beispiele für Analoge der Purinreihe sind neben Purin Xanthin, Hypoxanthin, Adenin, N-Methyladenin, N-Benzoyladenin, 2-Methylthioadenin, 2-Aminoadenin, 6-Hydroxypurin, 2-Amino-6-chlorpurin, 2-Amino-6-methylthiopurin, Guanin, N-Isobutyrylguanin. Besonders bevorzugt sind Adenin, 2-Aminoadenin und Guanin, sowie deren basengeschützte Derivate.

Wenn B in Formel I einen Pyrimidinrest darstellt, so handelt es sich bevorzugt um einen Uracil-, Thymin- oder Cytosinrest der Formel III, IIIa, IIIb oder IIIc

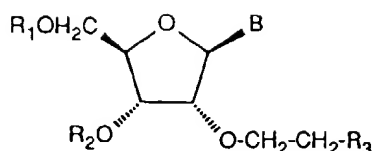


worin  $R_{b8}$  H oder  $C_1$ - $C_4$ -Alkyl und  $R_{b6}$  H, OH, SH,  $NH_2$ ,  $NHNH_2$ , NHOH,  $NHO$ - $C_1$ - $C_{12}$ -Alkyl,  $-N=CH-N(C_1-C_{12}-Alkyl)_2$ ,  $-N=CH$ -Azacycloalkyl, F, Cl, Br,  $C_1$ - $C_{12}$ -Alkyl, Hydroxy- $C_1$ - $C_{12}$ -alkyl, Amino- $C_1$ - $C_{12}$ -alkyl,  $C_1$ - $C_{12}$ -Alkoxy, Benzyloxy,  $C_1$ - $C_{12}$ -Alkylthio, wobei die Hydroxyl- und Aminogruppen unsubstituiert oder mit einer Schutzgruppe substituiert sind, Phenyl, Benzyl, Primäramino mit 1 bis 20 C-Atomen, Sekundäramino mit 2 bis 30 C-Atomen,  $C_1$ - $C_{12}$ -Alkenyl oder  $C_1$ - $C_{12}$ -Alkynyl bedeuten, und die  $NH_2$ -Gruppe in Formel IIIb unsubstituiert oder mit  $C_1$ - $C_6$ -Alkyl, Benzoyl oder einer Schutzgruppe substituiert ist, sowie die Dihydroderivate der Reste der Formeln III, IIIa, IIIb und IIIc. Bevorzugt stellt  $R_{b8}$  in Formel III H,  $C_1$ - $C_6$ -Alkyl oder -Hydroxyalkyl,  $C_2$ - $C_6$ -Alkenyl oder -Alkynyl, F, Cl, Br,  $NH_2$ , Benzoylamino, Mono- oder Di- $C_1$ - $C_6$ -alkylamino dar. Bevorzugt stellt  $R_{b6}$  in Formel IIIb und IIIc H,  $C_1$ - $C_6$ -Alkyl oder -Alkoxy oder -Hydroxyalkyl,  $C_2$ - $C_6$ -Alkenyl oder -Alkynyl, F, Cl, Br,  $NH_2$ , Benzoylamino, Mono- oder Di- $C_1$ - $C_6$ -alkylamino dar.

$R_{b6}$  steht bevorzugt für H oder Methyl.  $R_{b8}$  in Formel III bedeutet bevorzugt H, F, Cl, Br,  $NH_2$ ,  $NHCH_3$ ,  $N(CH_3)_2$ ,  $C_1$ - $C_4$ -Alkyl,  $C_2$ - $C_4$ -Alkenyl oder  $C_2$ - $C_4$ -Alkin-1-yl.  $R_{b8}$  in Formel IIIb und IIIc stellt bevorzugt H,  $C_1$ - $C_4$ -Alkyl, besonders Methyl,  $C_2$ - $C_4$ -Alkenyl, besonders Vinyl oder  $C_2$ - $C_4$ -Alkin-1-yl, besonders 1-Propin-1-yl, oder  $NH_2$ ,  $NHCH_3$  oder  $(CH_3)_2N$  dar.

Einige Beispiele für Pyrimidinanaloge sind Uracil, Thymin, Cytosin, 5-Fluoruracil, 5-Chloruracil, 5-Bromuracil, Dihydrouracil, 5-Methylcytosin, 5-Propinthymin und 5-Propincytosin.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der Formel I,



(I)

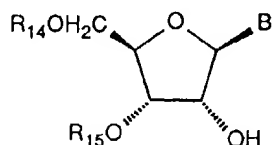
5

worin  $R_1$  und  $R_2$  unabhängig voneinander für Wasserstoff oder eine Schutzgruppe stehen;  
und B einen Purin- oder Pyrimidinrest oder ein Analoges davon bedeutet; und

10

(a)  $R_3$  OH bedeutet,

das dadurch gekennzeichnet ist, dass man eine Verbindung der Formel IVa

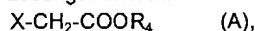


(IVa),

15

20

worin  $R_{14}$  und  $R_{15}$  für gleiche oder verschiedene Schutzgruppen stehen und B einen Purin- oder Pyrimidinrest oder ein Analoges davon bedeutet, wobei funktionelle Gruppen im Basenrest B durch Schutzgruppen geschützt sind, in einem inerten Lösungsmittel mit einer Verbindung der Formel A umgesetzt



worin  $R_4$   $C_1$ - $C_4$ -Alkyl und X Cl, Br, I, Tosyl-O oder Mesyl-O bedeutet;

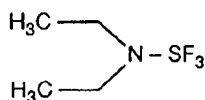
25

und die Esterfunktion anschließend mit  $NaBH_4$  oder  $LiAlH_4$  reduziert, wobei die entstehende OH-Gruppe vorübergehend mit einer Gruppe wie für  $R_1$  definiert geschützt werden kann;

(b)  $R_3$  F bedeutet,

das dadurch gekennzeichnet ist, dass man eine Verbindung der Formel I, worin  $R_3$  OH bedeutet, mit einer Verbindung der Formel B umgesetzt

30

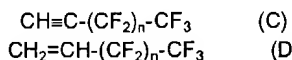


(B);

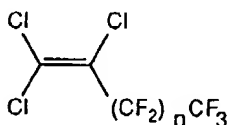
35

(c)  $R_3$   $-(CF_2)_n-CF_3$  bedeutet, worin n für eine Zahl von 0 bis 7 steht,

das dadurch gekennzeichnet ist, dass man eine Verbindung der Formel IVa mit einer Verbindung der Formel C, D oder E umgesetzt



40



(E)

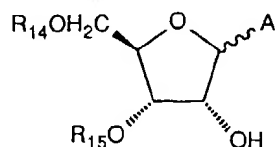
45

und anschließend die gegebenenfalls vorhandene Doppelbindung oder chlorierte Doppelbindung katalytisch zu  $CH_2CH_2(CF_2)_nCF_3$  reduziert;

50

(d)  $R_3$  OH, F oder  $-(CF_2)_n-CF_3$  bedeutet,

das dadurch gekennzeichnet ist, dass man eine Verbindung der Formel IVb



(IVb),

55



worin  $R_{14}$  und  $R_{15}$  die oben erwähnte Bedeutung haben und A für eine Abgangsgruppe, bevorzugt Alkoxy, Acyloxy, Mesyl-O, Tosyl-O und besonders bevorzugt  $OCH_3$ ,  $OCOCH_3$  und Benzoyloxy steht, nach einem der in (a) bis (c) beschriebenen Verfahren an der 2'-OH Gruppe substituiert und dann in an sich bekannter Weise den Basenrest B durch Substitution einführt [E. Lukevics, A. Zablocka, Nucleoside Synthesis, Ellis Horwood, New York (1991)]; und gegebenenfalls die Schutzgruppen  $R_{14}$  und  $R_{15}$  abspaltet.

Die Verbindungen der Formeln IVa und IVb, A, B, C, D und E sind bekannt, teilweise käuflich oder nach bekannten beziehungsweise analogen Verfahren herstellbar.

Inerte Lösungsmittel sind zum Beispiel Kohlenwasserstoffe, Halogenkohlenwasserstoffe, alkylierte Carbonsäureamide und Lactame, Ether, Nitrile wie Acetonitril, Dialkylsulfone oder -sulfoxide oder cyclische Sulfone und Sulfoxide.

Die Reaktionstemperaturen bei den Verfahrensstufen (a) bis (d) liegen zwischen  $-50$  bis  $200^\circ\text{C}$ , bevorzugt zwischen  $0$  bis  $90^\circ\text{C}$ .

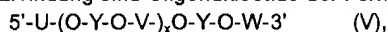
Die Umsetzungen werden ausser mit B vorteilhaft in Gegenwart von Basen durchgeführt, zum Beispiel Alkalimetallhydriden, -alkoholaten, -hydroxiden, -carbonaten, Trialkylaminen oder Diazabicycloundecen.

Die Isolierung der Verbindungen der Formel I und deren Reinigung erfolgt nach an sich bekannten Verfahren wie zum Beispiel Fällung oder Kristallisation und Filtration und chromatographischen Methoden.

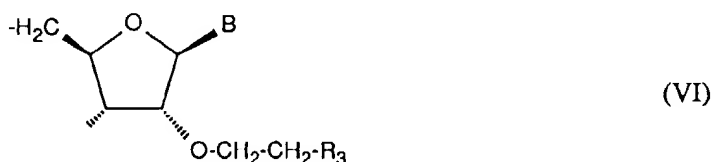
Aus den Verbindungen der Formel I können Oligonukleotide aufgebaut werden, die auf Grund ihrer Wechselwirkung mit Nukleinsäuren wertvolle biologische Aktivitäten aufweisen, und als pharmazeutische Wirkstoffe oder als Diagnostika verwendet werden können.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der Verbindungen der Formel I zur Herstellung von Oligonukleotiden, die gleiche oder verschiedene Monomereinheiten von Verbindungen der Formel I enthalten, jedoch mindestens eine Monomereinheit von Verbindungen der Formel I in Kombination mit Monomereinheiten von anderen natürlichen oder synthetischen Nukleosiden, wobei die Oligonukleotide 2 bis 200 Monomereinheiten enthalten. Bevorzugt enthalten die Oligonukleotide 2 bis 100, besonders bevorzugt 2 bis 50, und insbesondere bevorzugt 4 bis 30 Monomereinheiten. Bevorzugt sind Oligonukleotide, die gleiche oder verschiedene Monomereinheiten von Verbindungen der Formel I enthalten. Bevorzugt sind ferner Oligonukleotide, die zusätzlich Monomereinheiten von synthetischen oder natürlichen Nukleosiden enthalten, die sich von D-Ribose oder 2-Desoxyribose ableiten.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Oligonukleotide der Formel V



worin x eine Zahl von 0 bis 200 und Y eine Nukleotid-Brückengruppe bedeuten, U, V und W je für sich gleiche oder verschiedene Reste von natürlichen oder synthetischen Nukleosiden darstellen und mindestens einer der Reste U, V und/oder W einen Rest der Formel VI



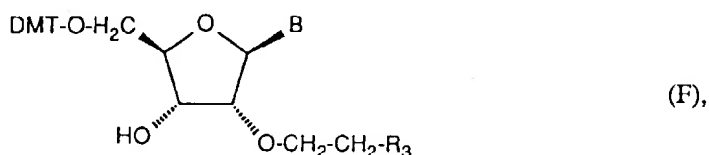
bedeutet, und B und  $R_3$  die für die Verbindungen der Formel I angegebenen Bedeutungen haben einschliesslich der Bevorzugungen und Beispiele.

Eine bevorzugte Brückengruppe Y ist die in natürlichen Oligonukleotiden vorkommende Gruppe  $-P(O)O^\ominus$ . Beispiele für weitere Brückengruppen sind  $P(O)S^\ominus$ ,  $-P(S)S^\ominus$ ,  $-P(O)R_{16}$ ,  $P(O)NR_{17}R_{18}$ , oder  $-CH_2$ , worin  $R_{16}$  H oder  $C_1$ - $C_6$ -Alkyl darstellt und  $R_{17}$  und  $R_{18}$  unabhängig voneinander die Bedeutung von  $R_{16}$  haben. In Formel V steht x bevorzugt für eine Zahl von 0 bis 100, besonders bevorzugt für eine Zahl von 1 bis 50 und insbesondere bevorzugt für eine Zahl von 3 bis 29. Die Reste der Formel VI können endständig oder in der Nukleotidsequenz gebunden sein, wobei alle oder mehrere, zum Beispiel 2 bis 5 Reste der Formel VI aufeinander folgen können, oder die Reste der Formel VI können zwischen Resten von natürlichen oder synthetischen Nukleosiden gebunden sein, oder es können Mischformen dieser Verteilungen in der Nukleotidsequenz vorliegen.

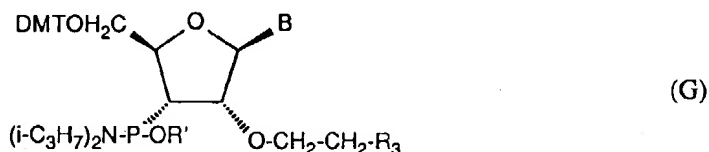
Eine ganz besonders bevorzugte Ausführungsform sind Oligonukleotide der Formel V, worin x eine Zahl von 2 bis 50, bevorzugt 2 bis 30 darstellt, Y für die Gruppe  $-P(O)O^\ominus$  steht, U, V und W je für sich gleiche oder verschiedene Reste eines natürlichen Nukleosids bedeuten und mindestens einer der Reste U, V oder W der Formel VI entspricht. Als natürliche Nukleoside kommen Adenosin, Cytidin, Guanosin, Uridin, 2-Aminoadenin, 5-Methylcytosin, 2'-Desoxyadenosin, 2'-Desoxycytidin, 2'-Desoxyguanosin und Thymidin in Frage. Als natürliche Nukleosidbasen sind besonders Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin und Uracil zu nennen. Die Reste der

Formel VI können endständig oder in der Nukleotidsequenz gebunden sein, wobei alle oder mehrere, zum Beispiel 2 bis 5 gleiche oder verschiedene Reste der Formel VI aufeinander folgen können, oder gleiche oder verschiedene Reste der Formel VI zwischen Resten von natürlichen Nukleosiden gebunden sind, oder Mischformen dieser Verteilungen in der Nukleotidsequenz vorliegen. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform von Oligonukleotiden der Formel V entsprechen sämtliche Reste U, V und W gleichen oder verschiedenen Resten der Formel VI. Bevorzugt stellt x eine Zahl von 3 bis 29 dar und bevorzugt sind insgesamt 1 bis 12 Reste der Formel VI enthalten.

Die Herstellung der erfindungsgemässen Oligonukleotide kann in an sich bekannter Weise nach verschiedenen Verfahren in gegebenenfalls automatisierten und zusammen mit Verfahrensvorschriften käuflichen DNA-Synthesizem erfolgen. Im Falle der Brückengruppe  $-P(O)O^-$  kann zum Beispiel das Phosphotriesterverfahren, das Phosphittriesterverfahren oder das H-Phosphonatverfahren angewendet werden, die dem Fachmann geläufig sind. Beim Phosphittriesterverfahren kann man zum Beispiel so vorgehen, dass man die Nukleoside der Formel I, worin  $R_1$  und  $R_2$  je H bedeuten, mit einem Schutzgruppenreagenz, zum Beispiel 4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl-chlorid zu einem Nukleosid der Formel F umsetzt



und die Verbindung der Formel F mit Hilfe eines "linkers", zum Beispiel Bernsteinsäureanhydrid, an ein festes Trägermaterial bindet, zum Beispiel an Controlled Pore Glass (CPG), das langkettige Alkylaminogruppen enthält. In einem separaten Verfahren wird die Hydroxylgruppe der Verbindung der Formel F derivatisiert, zum Beispiel zu einem Phosphoramidit unter Verwendung von  $R'OP[N(i\text{-Propyl})_2]_2$  zu einer Verbindung der Formel G



wobei  $R'$  zum Beispiel  $\beta$ -Cyanoethyl darstellt.

Nach dem Abspalten der Schutzgruppe wie zum Beispiel der DMT-Gruppe des an den Träger gebundenen Materials koppelt man unter Abspaltung von  $-N(i\text{-C}_3\text{H}_7)_2$  mit der Verbindung der Formel F, blockiert eventuell vorhandene freie Hydroxylgruppen (capping) und oxidiert dann das gebildete Phosphit zum Phosphat. Nach dem Entschützen des Dimeren wiederholt man den Reaktionszyklus mit einer Verbindung der Formel G, bis man ein Oligomer mit der gewünschten Anzahl an Monomereinheiten synthetisiert hat, und löst das Produkt vom Trägermaterial ab. Auf diese Weise erhält man Oligonukleotide, in denen sämtliche Reste U, V und W gemäss Formel V aus Resten der Formel VI bestehen. Auf diese Weise sind auch Oligonukleotide mit beliebigen Monomereinheiten in beliebiger Sequenz herstellbar, je nach Verwendung synthetischer, natürlicher und erfindungsgemässer Nukleosidbausteine in den einzelnen Reaktionszyklen.

Die erfindungsgemässen Verbindungen der Formel I, worin  $R_1$  und  $R_2$  je H bedeuten, weisen antivirale und antiproliferative Eigenschaften auf und können demgemäss als Arzneimittel Verwendung finden. Die erfindungsgemässen Oligonukleotide weisen zudem eine hohe Stabilität gegenüber einem Abbau durch Nukleasen auf. Besonders überraschend ist ihre ausgezeichnete Paarung mit komplementären Nukleinsäuresträngen, vor allem vom RNA-Typ. Zusätzlich zeigen sie eine unerwartet hohe zelluläre Aufnahme. Die erfindungsgemässen Oligonukleotide eignen sich daher besonders für die Antisense-Technologie, das heisst zur Inhibition der Expression unerwünschter Proteinprodukte durch die Bindung an geeignete komplementäre Nukleotidsequenzen von mRNA (EP 266,099, WO 87/07300 und WO 89/08146). Sie können zur Behandlung von Infektionen und Krankheiten zum Beispiel durch die Blockierung der Expression von bioaktiven Proteinen auf der Stufe der Nukleinsäuren (zum Beispiel Onkogene) eingesetzt werden. Die erfindungsgemässen Oligonukleotide eignen sich auch als Diagnostika und können als Gensonden zum Nachweis von viralen Infektionen oder genetisch bedingten Krankheiten durch selektive Interaktion auf der Stufe von einzel- oder doppelsträngigen Nukleinsäuren verwendet werden ("gene probes"). Im besonderen - bedingt durch die erhöhte

Stabilität gegenüber Nukleasen - ist eine diagnostische Anwendung nicht nur in vitro sondern auch in vivo (zum Beispiel Gewebeproben, Blutplasma und Blutserum) möglich. Solche Verwendungsmöglichkeiten sind zum Beispiel in der WO 91/06556 beschrieben.

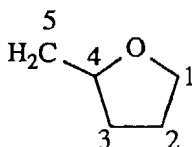
Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemässen Oligonukleotide als Diagnostika zum Nachweis von viralen Infektionen oder genetisch bedingten Krankheiten.

Ein anderer Gegenstand der Erfindung betrifft auch die erfindungsgemässen Nukleoside der Formeln I sowie die Oligonukleotide der Formel V zur Anwendung in einem therapeutischen Verfahren zur Behandlung von Krankheiten bei Warmblütern einschliesslich des Menschen durch Inaktivierung von Nukleotidsequenzen im Körper. Die Dosierung bei Verabreichung an Warmblüter von etwa 70 kg Körpergewicht kann zum Beispiel 0,01 bis 1000 mg pro Tag betragen. Die Verabreichung erfolgt vorzugsweise in Form pharmazeutischer Präparate parenteral, zum Beispiel intravenös oder intraperitoneal.

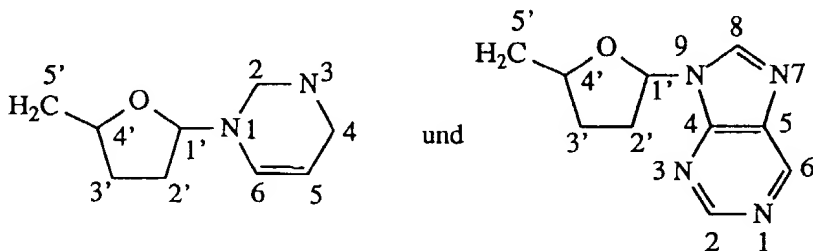
Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein pharmazeutisches Präparat, enthaltend eine wirksame Menge eines Nukleosids der Formeln I oder eines Oligonukleotids der Formeln V alleine oder zusammen mit anderen Wirkstoffen, ein pharmazeutisches Trägermaterial vorzugsweise in einer signifikanten Menge und gegebenenfalls Hilfsstoffe.

Man kann die pharmakologisch wirksamen erfindungsgemässen Nukleoside und Oligonukleotide in Form von parenteral verabreichbaren Präparaten oder von Infusionslösungen verwenden. Solche Lösungen sind vorzugsweise isotonische wässrige Lösungen oder Suspensionen, wobei diese zum Beispiel bei lyophilisierten Präparaten, welche die Wirksubstanz allein oder zusammen mit einem Trägermaterial, zum Beispiel Mannit, enthalten, vor Gebrauch hergestellt werden können. Die pharmazeutischen Präparate können sterilisiert sein und/oder Hilfsstoffe, zum Beispiel Konservier- Stabilisier-, Netz- und/oder Emulgiermittel, Löslichkeitsvermittler, Salze zur Regulierung des osmotischen Drucks und/oder Puffer enthalten. Die pharmazeutischen Präparate, die gewünschtenfalls weitere pharmakologisch wirksame Stoffe wie zum Beispiel Antibiotika enthalten können, werden in an sich bekannter Weise, zum Beispiel mittels konventioneller Lösungs- oder Lyophilisierungsverfahren, hergestellt, und enthalten etwa 0,1 % bis 90 %, insbesondere von etwa 0,5 % bis etwa 30 %, zum Beispiel 1 % bis 5 % Aktivstoff(e).

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung. Den  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren liegt die Nummerierung der Kohlenstoffatome in den folgenden cyclischen Kohlenstoffgerüsten zu Grunde:  
Ausgangsverbindungen:



Nukleoside (Beispiele):



Verwendete Abkürzungen im Text und in den Formeln:

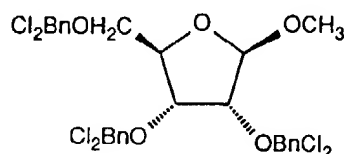
DMF	Dimethylformamid
$\text{ClBnCl}_2$	2,4-Dichlorbenzylchlorid
Bn	Benzyl
Ac	Acetyl
$\phi$	Phenyl
BSA	N,N-Bis(trimethylsilyl)acetamid
DBU	Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
BOM-Cl	Benzoyloxymethylchlorid

DMTCI 4,4'-Dimethoxytritylchlorid  
THF Tetrahydrofuran

#### A) Herstellung von Nukleosid-Analogen

##### Beispiel A1:

Zu einer Vorlage von 13,5 g NaH in 130 ml DMF werden bei 60°C 28,0 g 1-Methylribose zugetropft. Nach Ende der H<sub>2</sub>-Entwicklung werden 110,0 g ClBnCl<sub>2</sub> zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird 16 Stunden bei 25°C weitergerührt. Um noch vorhandenes NaH zu zerstören tropft man vorsichtig Methanol zu und giesst das Reaktionsgemisch dann auf Eis/Wasser. Der klumpige Niederschlag wird abfiltriert und mit Acetonitril gut nachgewaschen. Man erhält die Verbindung (A1).

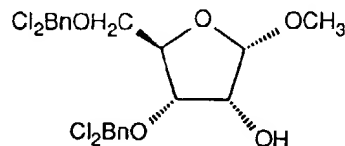


(A1).

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Das H-C(1)-Proton erscheint bei 5,0 ppm als Singulett. MS: 638 (M<sup>+</sup>)

##### Beispiel A2:

65,9 g des in Beispiel A1 hergestellten Produktes werden in 600 ml Methylenchlorid gelöst und auf 0°C gekühlt. Dann tropft man 121 ml SnCl<sub>4</sub> in 800 ml Methylenchlorid zu und lässt bei 3°C stehen. Nach 26 Stunden werden nochmals 2 ml SnCl<sub>4</sub> zugegeben. Nach total 35 Stunden wird die Reaktionslösung vorsichtig auf 700 ml einer gesättigten NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gegossen. Nach Verdünnung mit 400 ml Methylenchlorid wird der Sn-haltige Niederschlag abfiltriert. Die organische Phase des Filtrats wird mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und zur Verbindung (A2) eingedampft.

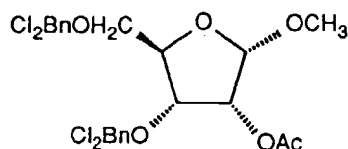


(A2).

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Das H-C(1)-Proton erscheint bei 4,90 ppm als Doublett mit J=5 Hz.

##### Beispiel A3:

125,9 g des in Beispiel A2 erhaltenen Produktes werden in 1 l Pyridin gelöst. Bei 20°C werden 25,5 g Acetanhydrid und 1 g 4-Dimethylaminopyridin zugegeben. Anschliessend wird 17 Stunden gerührt. Das Reaktionsgemisch wird in 1 l Wasser aufgenommen, mit konzentrierter Salzsäure angesäuert und mit Essigsäure-ethylester extrahiert. Der Extrakt wird mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und eingedampft. Schliesslich wird der Rückstand mit Hexan zur Kristallisation gebracht. Man erhält die Verbindung (A3).

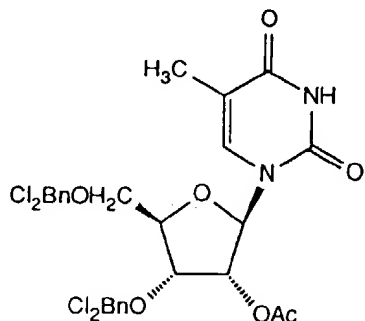


(A3).

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 5,15 [d, J=4,5 Hz, H-C(1)]; 3,50 (s, OCH<sub>3</sub>); 2,17 (s, OCOCH<sub>3</sub>);  
MS: 522 (M<sup>+</sup>)  
[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>=87,4±1,0°, CHCl<sub>3</sub> (0,998%)

Beispiel A4:

24 g Thymin werden in 100 ml 1,2-Dichlorethan aufgeschlämmt. Nach Zugabe von 116,4 g BSA wird unter Rückfluss erhitzt bis eine klare Lösung entsteht. Danach wird auf 50°C abgekühlt und es werden 50 g des in Beispiel A3 hergestellten Produktes sowie 27,5 g Trifluormethansulfonsäuretrimethylsilylester zugegeben. Es wird während 20 Stunden bei 70°C gerührt und anschliessend auf 300 ml NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gegossen und filtriert. Nach Extraktion mit Dichlorethan wird mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und eingedampft. Schliesslich wird der Rückstand mit Methanol zur Kristallisation gebracht. Man erhält die Verbindung (A4).

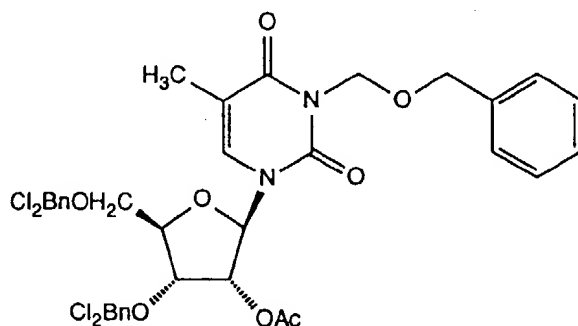


(A4).

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 8,25 (s, NH); 6,10 [d, J=4,5 Hz, H-C(1')]; 2,13 (s, OCOCH<sub>3</sub>); 1,66 (s, CH<sub>3</sub>)  
MS: 616 (M<sup>+</sup>)

Beispiel A5:

85 g des in Beispiel A4 hergestellten Produktes werden in 850 ml Acetonitril suspendiert. Es werden bei Raumtemperatur 24,2 g DBU und 24,9 g BOM-Cl zugetropft. Nach 20 Stunden Rühren wird das Reaktionsgemisch auf Wasser gegossen und mit Essigsäureethylester extrahiert. Der Extrakt wird mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und eingedampft. Man erhält die Verbindung (A5).

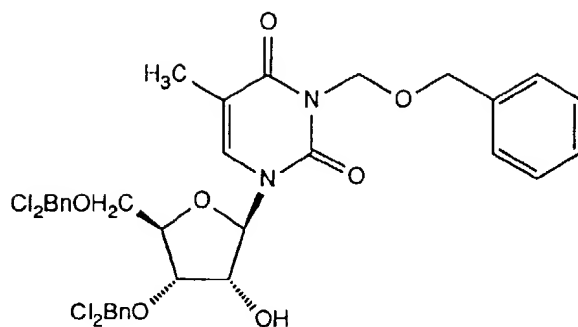


(A5).

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6,05 [d, J=4,5 Hz, H-C(1')]; 5,5 (AB, CH<sub>2</sub>); 5,37 [dd, H-C(2')]; 2,13 (s, OCOCH<sub>3</sub>); 1,55 (s, CH<sub>3</sub>)  
MS: 736 (M<sup>+</sup>)

Beispiel A6:

106 g des in Beispiel A5 hergestellten Produktes werden in 1 l THF suspendiert. Es werden 26 g einer 30 %igen NaOCH<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH-Lösung zugetropft. Nach 2,5 Stunden Rühren wird die Reaktionslösung auf Wasser gegossen, mit gesättigter wässriger Kochsalzlösung versetzt und mit Essigsäureethylester extrahiert. Nach Trocknung mit MgSO<sub>4</sub> wird der Extrakt eingedampft. Man erhält die Verbindung (A6).



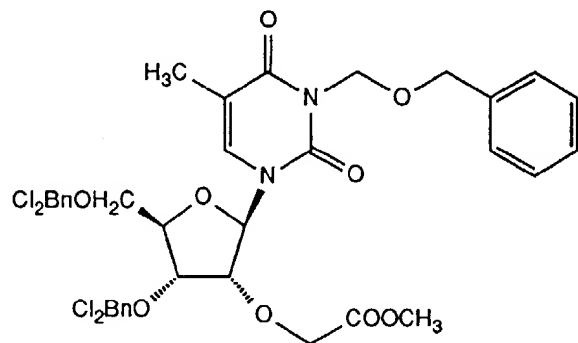
(A6).

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 5,93 [d, J=5 Hz, H-C(1')]; 5,5 (AB, CH<sub>2</sub>); 3,03 (d, J=6,5 Hz, OH); 1,72 (s, CH<sub>3</sub>)

MS: 694 (M<sup>+</sup>)

#### Beispiel A7:

79,4 g des in Beispiel A6 erhaltenen Produktes werden in 800 ml THF gelöst. Nach Zugabe von 3,3 g NaH wird kurz aufgekocht und anschliessend werden bei 40°C 21 g Bromessigsäuremethylester zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird insgesamt 27 Stunden bei 60°C gerührt, wobei nach 16 Stunden und nach 20 Stunden je 1 g NaH und 2 ml Bromessigsäuremethylester zugegeben werden. Schliesslich wird das Reaktionsgemisch auf Wasser gegossen und mit Essigsäureethylester extrahiert. Der Extrakt wird mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und eingedampft. Dabei erhält man die Verbindung (A7).



(A7).

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7,70 [s, H-C(6)]; 5,92 [s, H-C(1')]; 5,48 (AB, CH<sub>2</sub>); 3,75 (s, OCH<sub>3</sub>); 1,58 (s, CH<sub>3</sub>).

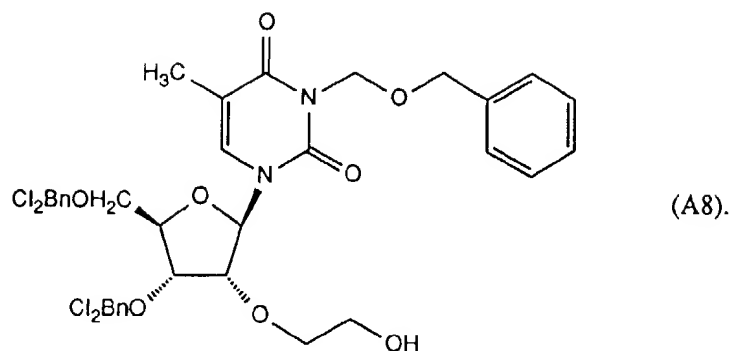
MS: 766 (M<sup>+</sup>).

#### Beispiel A8:

37 g des gemäss Beispiel A7 gewonnenen Produktes werden in 400 ml THF gelöst. Man gibt bei 20°C portionsweise 1,5 g LiBH<sub>4</sub> zu und rührt 1 Stunde lang. Danach giesst man das Reaktionsgemisch vorsichtig auf 500 ml Wasser und neutralisiert mit 32 ml 2 N wässriger Salzsäure. Nach Extraktion mit Essigsäureethylester und Eindampfen erhält man die Verbindung (A8).

5

10



15  $^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7,65 [s,  $\text{H-C}(6)$ ]; 5,96 [s,  $\text{H-C}(1')$ ]; 5,50 (AB,  $\text{CH}_2$ ); 2,57 (breites s, OH); 1,60 (s,  $\text{CH}_3$ ).  
MS: 738 ( $\text{M}^+$ ).

#### Beispiel A9:

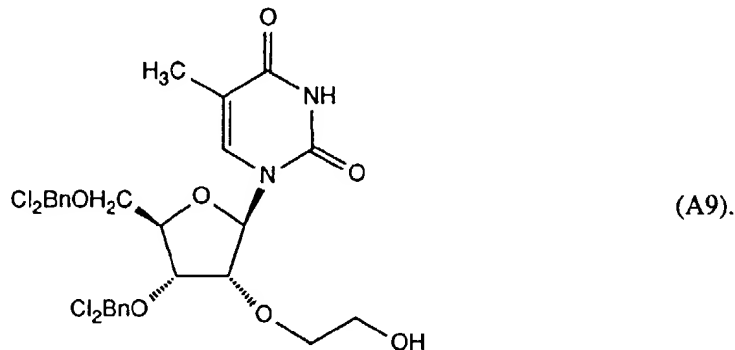
20

20,0 g des in Beispiel A8 hergestellten Produktes werden in 200 ml THF gelöst und über 2 g Pd/C (5%) bei 25°C und unter Normaldruck 4,5 Stunden hydriert ( $\text{H}_2$ -Aufnahme 102 %). Nach Filtration und Eindampfen des Filtrats wird der Rückstand in 170 ml Methanol gelöst und mit einer 30%igen  $\text{NaOCH}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ -Lösung auf einen pH-Wert von 11 eingestellt. Nach 24 Stunden giesst man auf 250 ml Wasser, säuert mit 2 N wässriger Salzsäure an und extrahiert mit Essigsäureethylester. Der Extrakt wird mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und eingedampft. Man erhält die Verbindung (A9).

30

35

40



$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 9,24 (s, NH); 7,90 [s,  $\text{H-C}(6)$ ]; 5,99 [s,  $\text{H-C}(1')$ ]; 2,68 (t, OH); 1,60 (s,  $\text{CH}_3$ ).  
MS: 618 ( $\text{M}^+$ ).

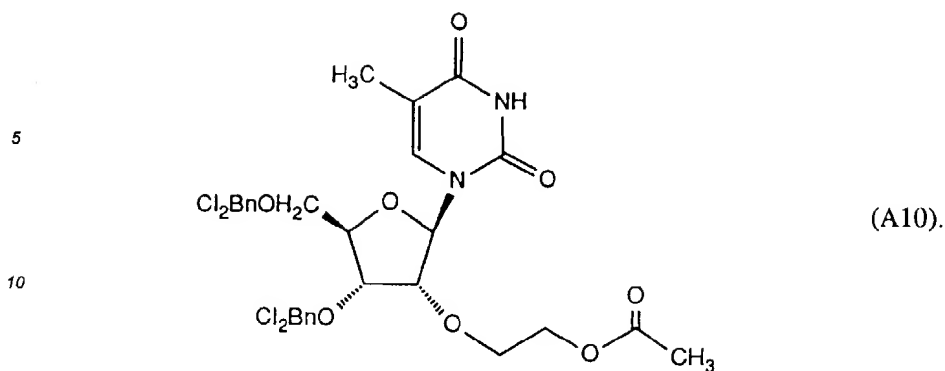
#### Beispiel A10:

45

4,2 g des in Beispiel A9 hergestellten Produktes werden in 50 ml Pyridin gelöst und nach Zugabe von 2,4 g Acetanhydrid wird 19 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird auf 100 ml 2 N HCl gegossen und mit Essigsäureethylester extrahiert. Der Extrakt wird mit 2 N HCl und Wasser gewaschen, über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und eingedampft. Man erhält die Verbindung (A10).

50

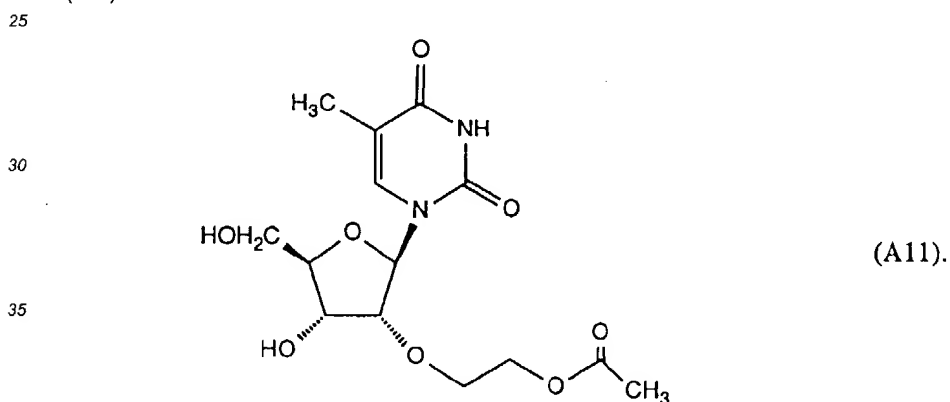
55



15  $^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 9,28 (s,  $\text{NH}$ ); 7,67 [s,  $\text{H-C}(6)$ ]; 5,95 [s,  $\text{H-C}(1')$ ]; 2,00 (s,  $\text{CH}_3$ ); 1,60 (s,  $\text{CH}_3$ ).  
MS: 663 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

#### Beispiel A11:

20 4,2 g des in Beispiel A10 hergestellten Produktes werden in 50 ml Methanol in Gegenwart von 2,09 g wasserfreiem Natriumacetat über 0,8 g Pd/C (5%) bei 35°C und unter Normaldruck hydriert. Nach 58 Stunden wird das Hydriergemisch filtriert und eingedampft. Der Rückstand wird zur Entfernung von Salzen über eine kleine Fritte mit Kieselgel chromatographiert (Essigsäureethylester/Methanol 9:1). Man erhält die Verbindung (A11).



40  $^1\text{H-NMR}$  (250 MHz, DMSO): 10,1 (s,  $\text{NH}$ ); 7,61 [s,  $\text{H-C}(6)$ ]; 5,64 [d,  $J=6$  Hz,  $\text{H-C}(1')$ ]; 1,70 (s,  $\text{CH}_3$ ); 1,57.  
MS: 379 ( $\text{M}+\text{Cl}$ ) $^-$ .

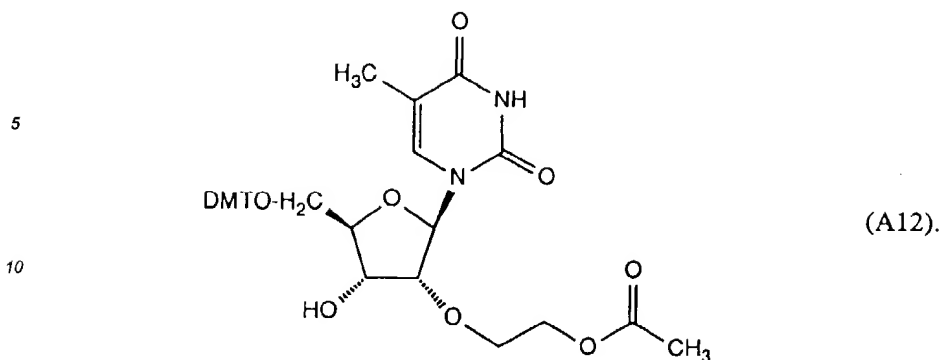
#### Beispiel A12:

45 2,27 g des in Beispiel A11 hergestellten Produktes werden zweimal in Pyridin aufgenommen und eingedampft. Man nimmt erneut in 30 ml Pyridin auf und gibt 2,57 g DMTCl dazu. Nach 20 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wird das Reaktionsgemisch mit 250 ml Essigsäureethylester verdünnt und auf 50 ml Wasser gegossen. Die organische Phase wird mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und eingeeengt. Den Rückstand chromatographiert man über Kieselgel (Toluol/Essigsäureethylester/Triethylamin 49:49:2). Man erhält die Verbindung (A12).

50

55

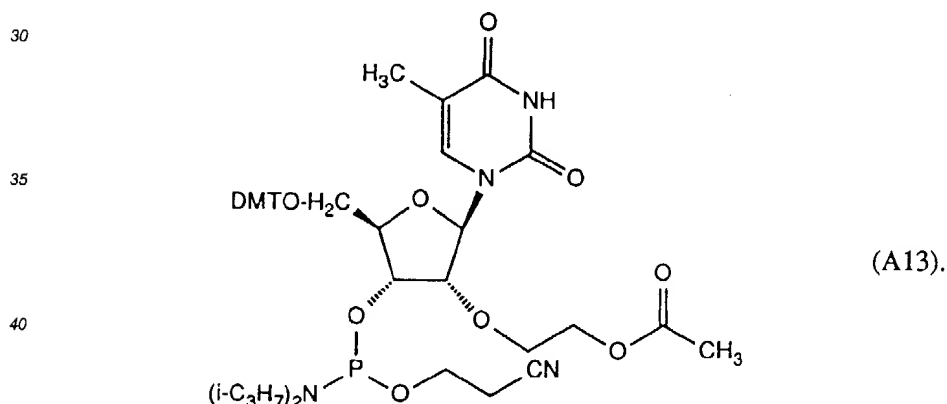




15  $^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 9,22 (s, NH); 7,70 [s,  $\text{H-C}(6)$ ]; 5,94 [d,  $J=1,5$  Hz,  $\text{H-C}(1')$ ]; 3,78 (s,  $\text{OCH}_3$ ); 2,19 (s,  $\text{CH}_3$ ); 1,36 (s,  $\text{CH}_3$ ).  
 MS: 706 ( $\text{M}+\text{NH}_4$ ) $^+$ .

#### Beispiel A13:

20 2,70 g des in Beispiel A12 erhaltenen Produktes werden zu einer Vorlage aus 0,93 g Düsopropylammoniumtetrazolid, 1,51 g 2-Cyanoethyl-N,N,N',N'-tetraisopropylphosphordiamidit und 30 ml Methylenchlorid gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 17 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und danach auf eine gesättigte wässrige  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung gegossen. Die organische Phase wird mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und eingedampft. Den Rückstand chromatographiert man über Kieselgel (Ethanol/Essigsäureethylester 1:1 mit 2 % Zusatz von Triethylamin). Der erhaltenen Schaum wird in 1 ml Methyl-t-butylether gelöst und bei  $0^\circ\text{C}$  in Pentan getropft. Man erhält die Verbindung (A13) (Diastereoisomere, 1:1).

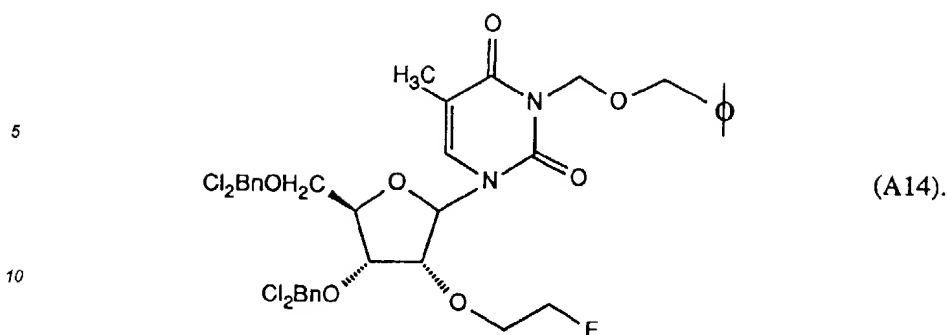


45  $^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7,74 [s,  $\text{H-C}(6)$ ] und 7,68 [s,  $\text{H-C}(6)$ ]; 6,08 [d,  $J=4$  Hz,  $\text{H-C}(1)$ ]; 5,97 [d,  $J=4$  Hz,  $\text{H-C}(1')$ ];  $^{31}\text{P-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 150,174 und 150,038 MS: 847 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$

#### Beispiel 14:

50 20,6 g des in Beispiel A8 erhaltenen Produktes werden in 200 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst. Bei  $5^\circ\text{C}$  werden 4,35 g Diethylamino-schwefeltrifluorid (DAST) zugetropft und das Reaktionsgemisch 3 Stunden bei  $5^\circ\text{C}$  gerührt. Danach giesst man die Lösung auf 300 ml gesättigte  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und extrahiert mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Der Extrakt wird über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird chromatographiert (Kieselgel, Toluol/Essigsäureethylester 1:1). Man erhält die Verbindung (A14).

55

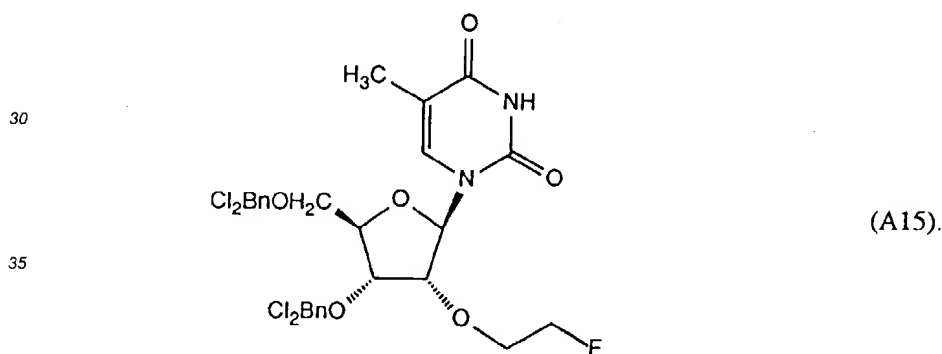


15  $^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7,68 [s, H-C(6)]; 5,92 [s, H-C(1')]; 5,50 [AB,  $\text{CH}_2$ ] 1,58 (s,  $\text{CH}_3$ ).  $^{19}\text{F-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): -223,74 (t,  $\text{CH}_2\text{F}$ ).  
MS: 758 ( $\text{M}+\text{NH}_4$ ) $^+$ .

#### Beispiel A15:

20 1,30 g des in Beispiel A14 erhaltenen Produktes werden in 26 ml THF gelöst und über 0,65 g Pd/C (5 %) bei 20°C und Normaldruck hydriert. Nach 0,5 Stunden wird der Katalysator abfiltriert und das Filtrat eingedampft. Der Rückstand wird in Methanol (15 ml) aufgenommen und mit NaOMe/MeOH-Lösung auf pH 11 eingestellt. Nach 20 Stunden Rühren wird auf 20 ml Wasser gegossen und mit Essigsäuremethylester extrahiert. Nach dem Eindampfen erhält man die Verbindung (A15).

25



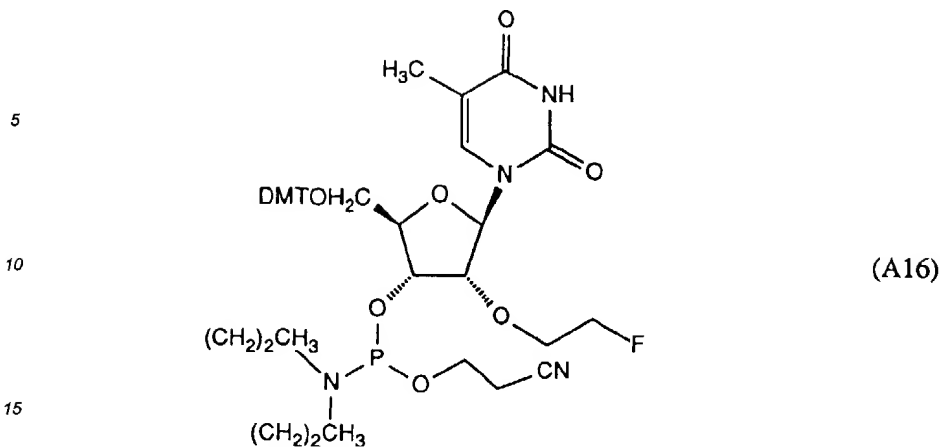
40  $^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 8,99 (s, NH); 7,61 [s, H-C(6)]; 5,88 [d,  $J=1,5\text{Hz}$ , H-C(1')]; 1,52 [s,  $\text{CH}_3$ ].  
MS: 621 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

#### Beispiel A16:

45 Analog den Arbeitsvorschriften (A11), (A12) und (A13) wird die Verbindung (A15) in das Phosphoramidit (A16) (Diastereoisomere, 1:1) überführt.

50

55

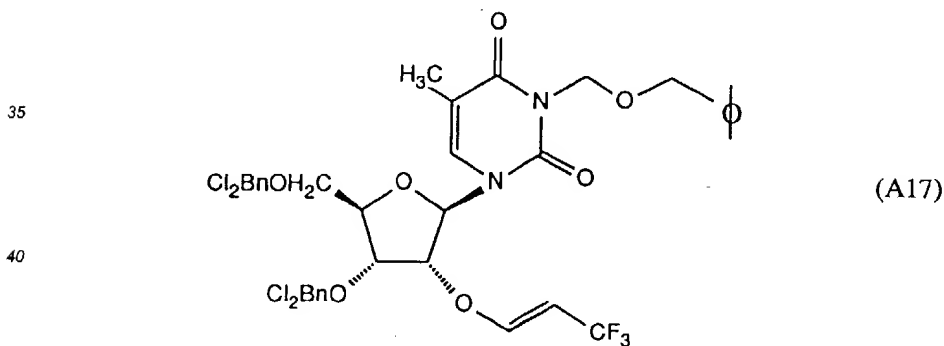


$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7,75 [s, H-C(6)] und 7,68 [s, H-C(6)]; 6,06 [d,  $J=4$  Hz, H-C(1')] und 6,00 [d,  $J=4$  Hz, H-C(1')].

$^{31}\text{P-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 150,107.

#### Beispiel A17:

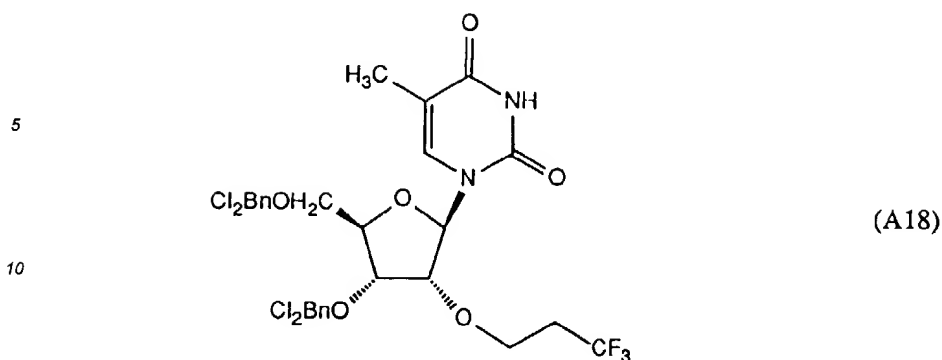
20,0 g der Verbindung (A6) werden in 200 ml THF gelöst und mit 0,83 g NaH (100 %) bis zur Beendigung der  $\text{H}_2$ -Entwicklung auf  $60^\circ\text{C}$  gehalten. Nach dem Abkühlen wird zu dieser Lösung im Autoklaven 48,0 g Tri-fluorpropin aufgespreßt und auf  $50^\circ\text{C}$  erwärmt. Nach 48 Stunden wird das Reaktionsgemisch zur Hälfte aufkonzentriert, dann auf Wasser gegossen und mit Essigsäureethylester extrahiert. Der Extrakt wird getrocknet ( $\text{MgSO}_4$ ) und eingedampft. Der Rückstand wird über Kieselgel chromatographiert (n-Hexan/Essigester 4:1). Man erhält die Verbindung (A17).



$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7,72 [s, H-C(6)]; 6,80 (d,  $J=8\text{Hz}$ ,  $\text{CH}=\text{C}$ ); 5,82 [s, H-C(1')]; 5,48 (AB,  $\text{CH}_2$ ); 4,85 (m,  $\text{CH}=\text{C}$ ); 1,58 (s,  $\text{CH}_3$ ).  
MS: 789 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

#### Beispiel A18:

10,0 g der Verbindung (A17) werden in 200 ml THF gelöst und über 2 g Pd/C bei Raumtemperatur und Normaldruck hydriert. Nach 1 Stunde wird der Katalysator abfiltriert und das Filtrat eingedampft. Der Rückstand wird analog dem Beispiel A15 mit NaOMe nachbehandelt und chromatographiert (Kieselgel; n-Hexan/Essigsäureethylester 2:1). Man erhält die Verbindung (A18).

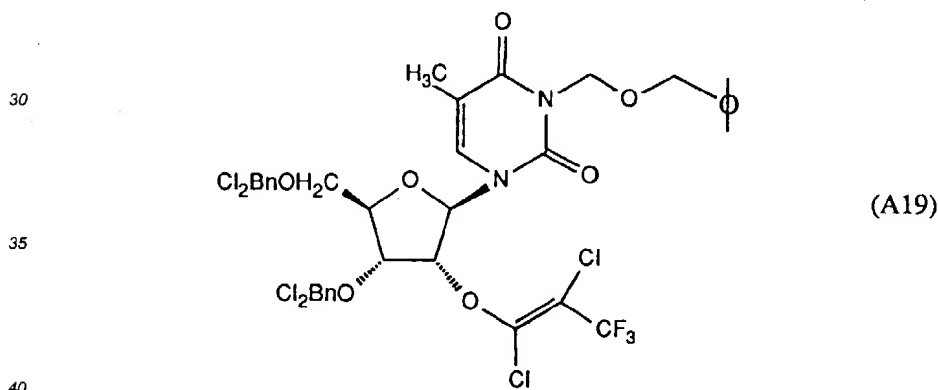


15  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 9,00 (s, NH); 7,66 [s, H-C(6)]; 5,93 [d,  $J=1,5$  Hz, H-C(1')]; 1,61 (s,  $\text{CH}_3$ ).  
 $^{19}\text{F-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): -65,23.  
 MS: 705 ( $\text{M}+\text{Cl}$ ) $^-$ .

20 Beispiel A19:

8,9 g der Verbindung (A6) werden in 90 ml THF gelöst und mit 0,34 g NaH (100 %) kurz aufgekocht. Nach dem Abklingen der  $\text{H}_2$ -Entwicklung werden bei 20°C 5,1 g 1,1,2-Trichlor-3,3,3-trifluorpropen zugetropft und anschliessend 5 Stunden bei 55°C gerührt. Das Reaktionsgemisch wird auf Wasser gegossen und mit Essigsäureethylester extrahiert. Nach dem Eindampfen wird chromatographiert (Kieselgel, Toluol/Essigsäureethylester 4:1). Man erhält die Verbindung (A19) als cis/trans(etwa 1:1)-Gemisch.

25



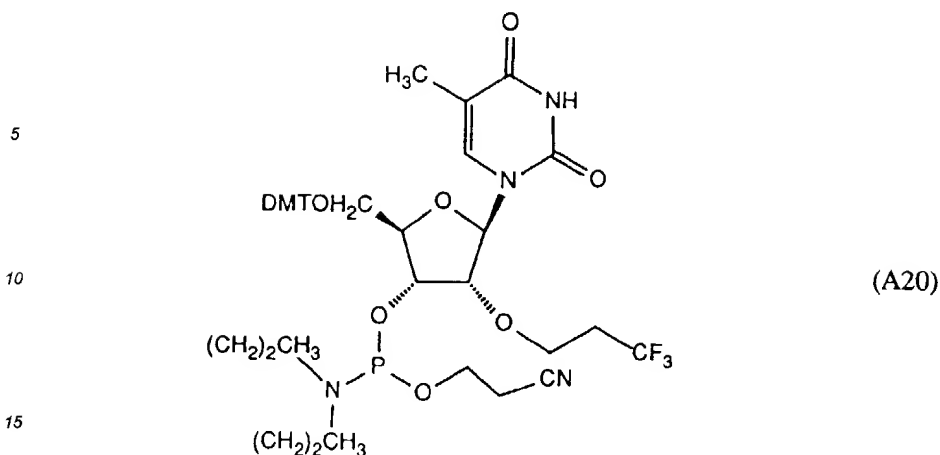
$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 7,63 und 7,60 [je s, je H-C(6)]; 5,91 und 5,87 [je s, je H-C(1')]; 1,61 und 1,57 (je s, je  $\text{CH}_3$ ).  
 MS: 891 ( $\text{M}+\text{Cl}$ ) $^-$ .

45 Beispiel A20:

Wird die Verbindung (A18) oder (A19) analog den obigen Beispielen entschützt und in das Phosphoramidit überführt, so erhält man die Verbindung (A20) (Diastereoisomere 1:1).

50

55



<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): 8,6 (breites s, NH); 7,74 und 7,69 [je s, je H-C(6)]; 5,97 und 5,94 [je d, J=4 Hz, je H-C(1')].  
<sup>31</sup>P-NMR (CDCl<sub>3</sub>): 150,287 und 150,035 ppm.

#### Beispiel B:

##### Herstellung von Oligonukleotiden

Oligonukleotide werden unter Verwendung der erfindungsgemässen dimethoxytritylierten und 3'-aktivierten [3'-(β-Cyanoethoxy-di(i-propylamino)phosphoramidit)] Nukleoside bzw. solchen natürlichen aktivierten Nukleosiden an einen festen Träger gebunden (Controlled Pore Glas, CPG) und die Synthese auf einem DNA-Synthesiser (Applied Biosystems, Modell 380 B, Standard Phosphoramiditchemie und Iodoxidation) gemäss den Standardprotokollen des Herstellers durchgeführt [vergleiche auch "Oligonucleotide synthesis a practical approach" M.J Gait; IRL Press 1984 (Oxford-Washington DC)]. Nach der Kopplung des letzten Nukleosidbausteins wird das 5'-geschützte Oligonukleotid unter gleichzeitiger Abspaltung aller übrigen Schutzgruppen durch Behandlung mit konzentriertem wässrigem Ammoniak über Nacht vom Träger abgelöst und anschliessend unter Verwendung von 50 mM Ammoniumacetatpuffer (pH 7)/Acetonitril durch "reverse-phase" HPLC gereinigt. Anschliessend wird die 5'-Dimethoxytrityl-Schutzgruppe durch 20-minütige Behandlung mit 80 %-iger wässriger Essigsäure abgespalten, das Oligonukleotid mit Ethanol ausgefällt und durch Zentrifugation isoliert. Die Reinheit des Oligonukleotids wird durch Gelelektrophorese (Polyacrylamid), seine Identität mittels matrixunterstützter Laserdesorptions-Time-of-flight Massenspektroskopie (MALDI-TOF MS) überprüft.

#### Beispiel C1:

Affinität; Wechselwirkung der Oligonukleotide (Antisense) mit komplementären Oligoribonukleotidsequenzen (Sense)

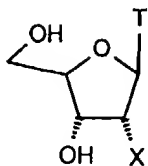
Die Wechselwirkung der Oligonukleotide mit den entsprechenden basenkomplementären Oligomeren der natürlichen Ribonukleotide wird durch das Aufzeichnen von UV-Schmelzkurven und den daraus ermittelten T<sub>m</sub>-Werten charakterisiert. Diese Standardmethode ist zum Beispiel von Marky, L.A., Breslauer, K.J., Biopolymers 26:1601-1620 (1987) beschrieben.

Es wird eine Lösung der Oligonukleotide und der entsprechenden basenkomplementären natürlichen Oligoribonukleotide in 10 mM Phosphatpuffer, 100 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, pH = 7,0 (c = 4 · 10<sup>-6</sup> M/Oligonukleotid) hergestellt und die Änderung der Extinktion bei 260 nm in Abhängigkeit von der Temperatur (15 bis 95°C) aufgezeichnet. Aus den erhaltenen Schmelzkurven wird der T<sub>m</sub>-Wert ermittelt (Tabelle 3).

Tabelle 3: Affinität

5 (a) TTTTCTCTCTCTCT (vs. RNA)

10



15

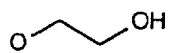
X	T <sub>m</sub> (°C)	ΔT <sub>m</sub> (°C)
---	---------------------	----------------------

20

H

51,8

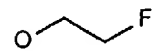
0



53,1

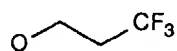
+ 1,3

25



53,5

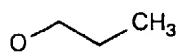
+ 1,7



53,0

+ 1,2

30



53,0

+ 1,2

35

40

45

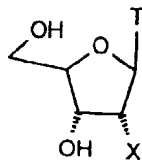
50

55

## (b) tCCAGGtGtCCGCAtC (vs. RNA)

5

10



15

X

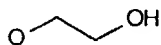
 $T_m(^{\circ}\text{C})$  $\Delta T_m(^{\circ}\text{C})/\text{mod.}$ 

20

H

62,3

0



70,5

+ 1,0



68,0

+ 1,4



65,1

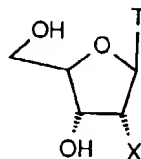
+ 0,7

25

## (c) GCGttttttttGCG (vs. RNA)

30

35



X

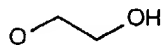
 $T_m(^{\circ}\text{C})$  $\Delta T_m(^{\circ}\text{C})/\text{mod.}$ 

40

H

50,2

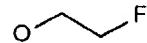
0



62,4

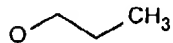
+ 1,2

45



61,9

+ 1,2



58,1

+ 0,8

50

Beispiel D2:

Spezifität; Wechselwirkung des Oligonukleotids mit basenkomplementären Oligoribonukleotiden, in welche ein falsches Nukleosid (Y) eingebaut wurde

Man stellt Lösungen des Oligonukleotids mit den entsprechenden basenkomplementären Oligonukleotiden der Sequenzen r(GGA CCG GAA YGG TAC GAG) in 10 mM Phosphatpuffer, 100 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, pH 7, ( $c = 4 \cdot 10^{-6}$  M/Oligonukleotid) her und misst die Änderung der Extinktion bei 260 nm in Abhängigkeit von der Temperatur (15°C bis 95°C). Aus den Kurven wird der  $T_m$ -Wert ermittelt. Die Ergebnisse

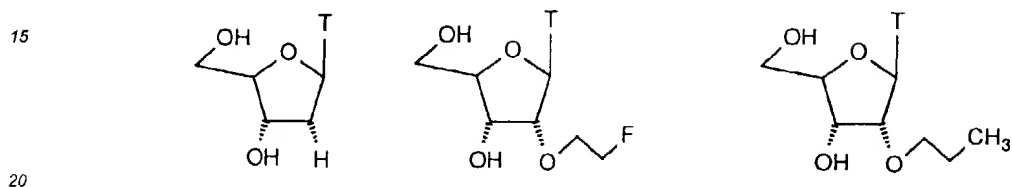
sind in der Tabelle 4 angegeben.

5 Tabelle 4: Spezifität

sense: 3'-GAG CAU GGY AAG GCC AGG-5' (RNA)

10 anti: 5'-CTC GTA CCT TTC CGG TCC-3' (DNA)

T<sub>m</sub>(°C) resp. ΔT<sub>m</sub>



	Y=A	63,3	65,0	69,4
25	Y=C	54,5	55,5	55,8
		(- 8,9)	(- 9,5)	(- 8,6)
	Y=G	61,6	59,7	60,5
30		(- 1,7)	(- 5,3)	(- 4,0)
	Y=U	55,8	56,2	56,8
		(- 7,5)	(- 8,8)	(- 7,7)
	Y=none	59,4	56,1	57,4
35		(- 3,9)	(- 8,9)	(- 7,0)

Beispiel C3:

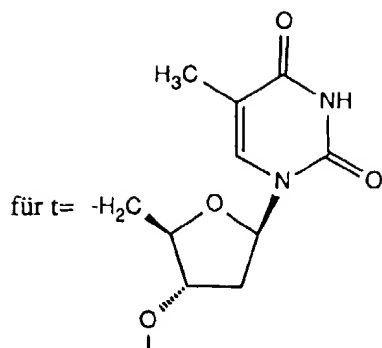
40 Nucleasestabilität; Enzymatische Hydrolyse verschiedener Oligonukleotide der Sequenz d(TCC AGG TGT CCG ttt C)

Je 14 µg des synthetischen Oligonukleotids beziehungsweise des entsprechenden natürlichen Oligomers werden in 200 µl 10%-igem Hitze-inaktiviertem Serum aus Kalbsföten bei 37°C inkubiert (c = 70 µg/ml). Nach 0,5; 1; 2; 4; 6; 24 und 48 Stunden werden jeweils 15 µl der Reaktionslösung durch Zugabe zu 25 µl 9 M Harnstoff und Trisborat-Puffer (pH 7) gequencht und bis zur Messung bei -20°C gelagert. Die gequenchten Reaktionslösungen werden mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Spaltprodukte über den Phosphorgehalt bestimmt (Phospho-imagers-Methode). Das Verhältnis R der Summe der Konzentrationen des völlig intakten Oligonukleotids ( $c_n^{(0)}$ ) und des durch Abspaltung des natürlichen C-Bausteins vom 3'-Ende entstehenden Fragments ( $c_{n-1}^{(t)}$ ) zu einer gegebenen Zeit t zur Ausgangskonzentration des völlig intakten Oligonukleotids zum Zeitpunkt t = 0 ( $c_n^{(0)}$ )  $R = (c_n^{(t)} + c_{n-1}^{(t)})/c_n^{(0)}$  wird gegen die Zeit graphisch aufgetragen. Die dabei ermittelten Halbwertszeiten  $\tau_{1/2}$  - das sind jene Zeiten, für die R=0,5 - betragen



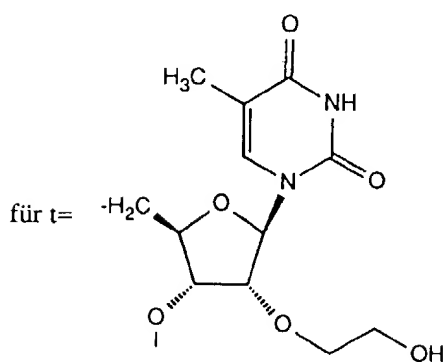
5

10

 $\tau_{1/2} = 1,7 \text{ h,}$ 

15

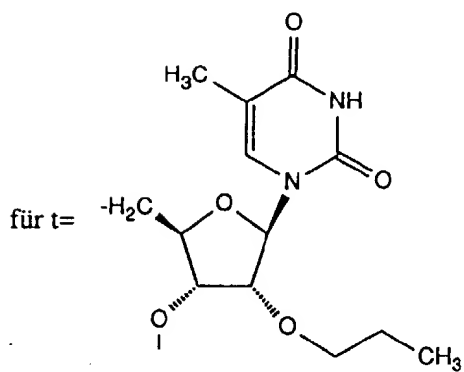
20

 $\tau_{1/2} = 40 \text{ h}$ 

25

30

35

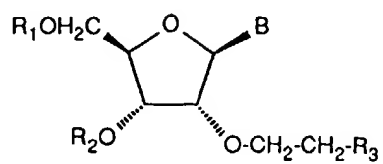
 $\tau_{1/2} = 10 \text{ h.}$ 

40

#### 45 Patentansprüche

##### 1. Verbindungen der Formel I

50



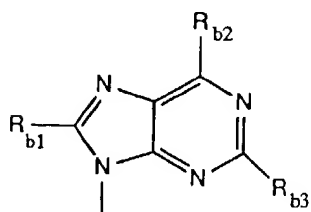
(I)

55

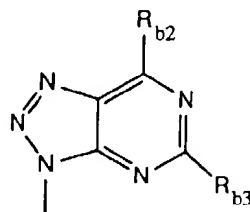
worin  $R_1$  und  $R_2$  unabhängig voneinander für Wasserstoff oder eine Schutzgruppe stehen oder  $R_1$  diese Bedeutungen hat und  $R_2$  für einen eine phosphorhaltige Nukleotid-Brückengruppe bildenden Rest steht; B einen Purin- oder Pyrimidinrest oder ein Analoges davon bedeutet; und  $R_3$  für OH, F oder  $(CF_2)_nCF_3$

steht, worin n eine Zahl von 0 bis 7 bedeutet.

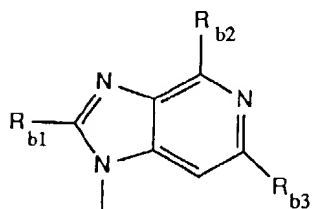
2. Verbindungen gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass  $R_1$  und  $R_2$  je für Wasserstoff stehen.
3. Verbindungen gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass  $R_1$  und  $R_2$  gleiche Schutzgruppen bedeuten.
4. Verbindungen gemäss Anspruch 1, worin B als Purinrest oder einem Analogen davon einen Rest der Formel II, IIa, IIb, IIc, IId, IIe oder IIf darstellt,



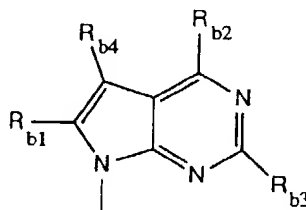
(II),



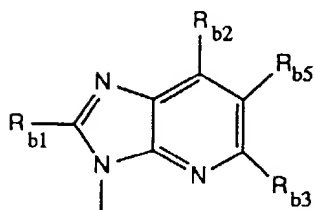
(IIa),



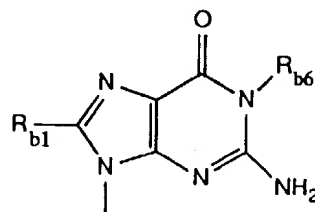
(IIb),



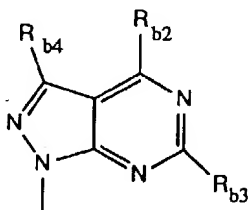
(IIc),



(IId),



(IIe),



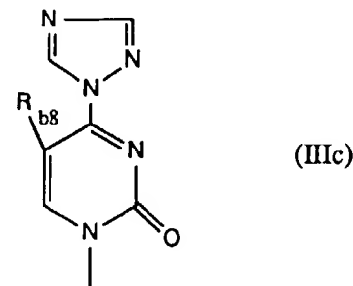
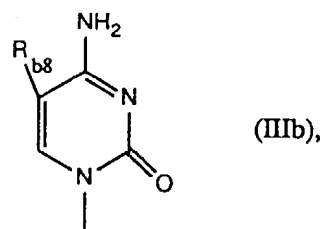
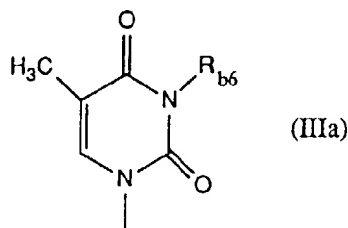
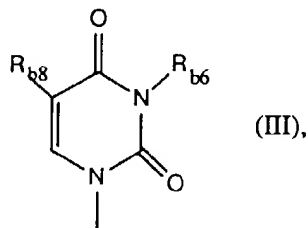
(IIf),

worin  $R_{b1}$  für H, Cl, Br, OH oder  $-O-C_1-C_{12}$ -Alkyl steht, und  $R_{b2}$ ,  $R_{b3}$  und  $R_{b5}$  unabhängig voneinander H, OH, SH,  $NH_2$ ,  $NHNH_2$ ,  $NHOH$ ,  $NHO-C_1-C_{12}$ -Alkyl,  $-N=CH-N(C_1-C_{12}-Alkyl)_2$ ,  $-N=CH$ -Azacycloalkyl, F, Cl, Br,  $C_1-C_{12}$ -Alkyl, Hydroxy- $C_1-C_{12}$ -alkyl, Amino- $C_1-C_{12}$ -alkyl,  $C_1-C_{12}$ -Alkoxy, Benzyloxy,  $C_1-C_{12}$ -Alkylthio, wobei die Hydroxyl- und Aminogruppen unsubstituiert oder mit einer Schutzgruppe substituiert sind, Phenyl, Benzyl, Primäramino mit 1 bis 20 C-Atomen oder Sekundäramino mit 2 bis 30 C-Atomen bedeuten,  $R_{b4}$  Wasserstoff, CN oder  $-C\equiv C-R_{b7}$  sowie  $R_{b6}$  und  $R_{b7}$  Wasserstoff oder  $C_1-C_4$ -Alkyl darstellen.

5. Verbindungen gemäss Anspruch 4, worin die Schutzgruppe für Hydroxyl- und Aminogruppen  $C_1-C_8$ -Acyl darstellt.
6. Verbindungen gemäss Anspruch 4, worin das Primäramino 1 bis 12 C-Atome und das Sekundäramino 2

bis 12 C-Atome enthält.

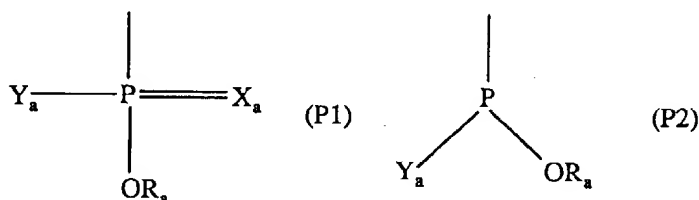
7. Verbindungen gemäss Anspruch 4, worin es sich bei dem Primäramino und Sekundäramino um Reste der Formel  $R_{a1}R_{a2}N$  handelt, worin  $R_{a1}$  für H steht oder unabhängig die Bedeutung von  $R_{a2}$  hat, und  $R_{a2}$  C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-Alkyl, -Aminoalkyl, -Hydroxyalkyl; Carboxyalkyl oder Carbalkoxyalkyl, wobei die Carbalkoxygruppe 2 bis 8 C-Atome enthält und die Alkylgruppe 1 bis 6, bevorzugt 1 bis 4 C-Atome; C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>-Alkenyl; Phenyl, Mono- oder Di-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl- oder Alkoxy)phenyl, Benzyl, Mono- oder Di-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl- oder -Alkoxy)benzyl; oder 1,2-, 1,3- oder 1,4-Imidazolyl-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl darstellt, oder  $R_{a1}$  und  $R_{a2}$  zusammen Tetra- oder Pentamethylen, 3-Oxa-1,5-pentyl, -CH<sub>2</sub>-NR<sub>a3</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- oder -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NR<sub>a3</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- darstellen, worin  $R_{a3}$  für H oder C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl steht, wobei die Aminogruppe im Aminoalkyl unsubstituiert oder mit ein oder zwei C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl oder -Hydroxyalkylgruppen substituiert ist, und die Hydroxylgruppe im Hydroxyalkyl gegebenenfalls mit C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl verethert ist.
8. Verbindungen gemäss Anspruch 6, worin es sich bei dem Primäramino und Sekundäramino um Methyl-, Ethyl-, Dimethyl-, Diethyl-, Allyl-, Mono- oder Di-(hydroxyeth-2-yl)-, Phenyl- und Benzyl-, Acetyl-, Isobutyryl und Benzoylamino handelt.
9. Verbindungen gemäss Anspruch 4, worin  $R_{b1}$  in den Formeln II, IIb, IIc, IId und IIe für Wasserstoff steht.
10. Verbindungen gemäss Anspruch 4, worin  $R_{b5}$  in Formel IId für Wasserstoff steht.
11. Verbindungen gemäss Anspruch 4, worin  $R_{b2}$  und  $R_{b3}$  in den Formeln II, IIa, IIb, IIc, IId und IIf unabhängig voneinander H, F, Cl, Br, OH, SH, NH<sub>2</sub>, NHOH, NHHN<sub>2</sub>, Methylamino, Dimethylamino, Benzoylamino, Methoxy, Ethoxy und Methylthio darstellen.
12. Verbindungen gemäss Anspruch 4, worin B ein Purinrest oder ein Rest eines Purinanalogen aus der Reihe Adenin, N-Methyladenin, N-Benzoyladenin, 2-Methylthioadenin, 2-Aminoadenin, 6-Hydroxypurin, 2-Amino-6-chlorpurin, 2-Amino-6-methylthiopurin, Guanin und N-Isobutyrylguanin ist.
13. Verbindungen gemäss Anspruch 1, worin B in Formel I als Pyrimidinrest einen Uracil-, Thymin- oder Cytosinrest der Formel III, IIIa, IIIb oder IIIc darstellt,



- worin  $R_{b6}$  H oder C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl und  $R_{b8}$  H, OH, SH, NH<sub>2</sub>, NHHN<sub>2</sub>, NHOH, NHO-C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-Alkyl, -N=CH-N(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-Alkyl)<sub>2</sub>, -N=CH-Azacycloalkyl, F, Cl, Br, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-Alkyl, Hydroxy-C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-alkyl, Amino-C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-alkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-Alkoxy, Benzyloxy, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-Alkylthio, wobei die Hydroxyl- und Aminogruppen unsubstituiert oder mit einer Schutzgruppe substituiert sind, Phenyl, Benzyl, Primäramino mit 1 bis 20 C-Atomen,

Sekundäramino mit 2 bis 30 C-Atomen, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-Alkenyl oder C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-Alkynyl bedeuten, und die NH<sub>2</sub>-Gruppe in Formel IIIb unsubstituiert oder mit C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl, Benzoyl oder einer Schutzgruppe substituiert ist, sowie die Dihydroderivate der Reste der Formeln III, IIIa, IIIb und IIIc.

- 5 14. Verbindungen gemäss Anspruch 13, worin R<sub>b8</sub> H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl oder -Hydroxyalkyl, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-Alkenyl oder -Alkynyl, F, Cl, Br, NH<sub>2</sub>, Benzoylamino, Mono- oder Di-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-alkylamino darstellt.
15. Verbindungen gemäss Anspruch 13, worin R<sub>b8</sub> H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl oder -Alkoxy oder -Hydroxyalkyl, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-Alkenyl oder Alkynyl, F, Cl, Br, NH<sub>2</sub>, Benzoylamino, Mono- oder Di-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-alkylamino darstellt.
- 10 16. Verbindungen gemäss Anspruch 14, worin R<sub>b8</sub> H, F, Cl, Br, NH<sub>2</sub>, NHCH<sub>3</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl, C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>-Alkenyl-(1) oder C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>-Alkynyl-(1) bedeutet.
17. Verbindungen gemäss Anspruch 15, worin R<sub>b8</sub> H, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl, C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>-Alkenyl-(1), C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>-Alkynyl-(1), NH<sub>2</sub>, NHCH<sub>3</sub> oder (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>N bedeutet.
- 15 18. Verbindungen gemäss Anspruch 1, worin B als Rest eines Pyrimidinanalogen sich von Uracil, Thymin, Cytosin, 5-Fluoruracil, 5-Chloruracil, 5-Bromuracil, Dihydrouracil, 5-Methylcytosin, 5-Propinthymin und 5-Propincytosin ableitet.
- 20 19. Verbindungen gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass R<sub>2</sub> als phosphorhaltiger eine Nukleotid-Brückengruppe bildender Rest der Formel P1 oder P2

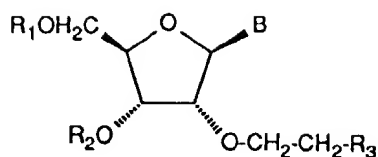


entspricht, worin Y<sub>a</sub> Wasserstoff, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-Alkyl, C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>-Aryl, C<sub>7</sub>-C<sub>20</sub>-Aralkyl, C<sub>7</sub>-C<sub>20</sub>-Alkaryl, -OR<sub>b</sub>, -NH<sub>2</sub>, Primäramino, Sekundäramino, O<sup>⊖</sup>M<sup>⊕</sup> oder S<sup>⊖</sup>M<sup>⊕</sup> darstellt; X<sub>a</sub> Sauerstoff oder Schwefel bedeutet; R<sub>a</sub> Wasserstoff, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-Alkyl, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-Alkenyl, C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>-Aryl, oder die Gruppe R<sub>a</sub>O- für N-Heteroaryl-N-yl mit 5 Ringgliedern und 1 bis 3 N-Atomen steht; R<sub>b</sub> Wasserstoff, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-Alkyl oder C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>-Aryl bedeutet; und M<sup>⊕</sup> für Na<sup>⊕</sup>, K<sup>⊕</sup>, Li<sup>⊕</sup>, NH<sub>4</sub><sup>⊕</sup> steht oder Primär-, Sekundär-, Tertiär- oder Quaternärammonium darstellt; wobei Alkyl, Aryl, Aralkyl und Alkaryl in Y<sub>a</sub>, R<sub>a</sub> und R<sub>b</sub> unsubstituiert oder mit Alkoxy, Alkylthio, Halogen, -CN, -NO<sub>2</sub>, Phenyl, Nitrophenyl, oder Halogenphenyl substituiert ist.

35

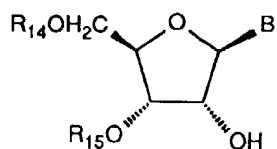
- 40 20. Verbindungen gemäss Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass R<sub>a</sub> β-Cyanoethyl bedeutet, und Y<sub>a</sub> Di(i-propyl)amino darstellt.
21. Verbindung gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass R<sub>3</sub> OH bedeutet.
- 45 22. Verbindungen gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass R<sub>3</sub> F bedeutet.
23. Verbindungen gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass R<sub>3</sub> (CF<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CF<sub>3</sub> und n eine Zahl von 0 bis 7 bedeutet.
- 50 24. Verbindungen gemäss Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass n die Zahl 0 bedeutet.
25. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der Formel I,

55



(I)

worin  $R_1$  und  $R_2$  unabhängig voneinander für Wasserstoff oder eine Schutzgruppe stehen;  
 B einen Purin- oder Pyrimidinrest oder ein Analoges davon bedeutet; und  
 (a)  $R_3$  OH bedeutet,  
 dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung der Formel IVa



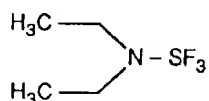
(IVa),

worin  $R_{14}$  und  $R_{15}$  für gleiche oder verschiedene Schutzgruppen stehen und B einen Purin- oder Pyrimidinrest oder ein Analoges davon bedeutet, wobei funktionelle Gruppen im Basenrest B durch Schutzgruppen geschützt sind, in einem inerten Lösungsmittel mit einer Verbindung der Formel A umsetzt



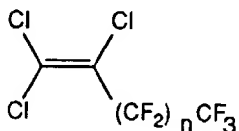
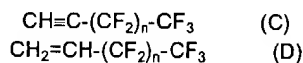
worin  $R_4$   $C_1$ - $C_4$ -Alkyl und X Cl, Br, I, Tosyl-O oder Mesyl-O bedeutet;  
 und die Esterfunktion anschliessend mit  $NaBH_4$  oder  $LiAlH_4$  reduziert, wobei die entstehende OH-Gruppe vorübergehend mit einer Gruppe wie für  $R_1$  definiert geschützt werden kann;

(b)  $R_3$  F bedeutet,  
 dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung der Formel I, worin  $R_3$  OH bedeutet, mit einer Verbindung der Formel B umsetzt



(B);

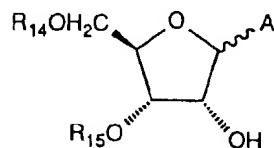
(c)  $R_3$   $-(CF_2)_n-CF_3$  bedeutet, worin n für eine Zahl von 0 bis 7 steht,  
 dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung der Formel IVa mit einer Verbindung der Formel C, D oder E umsetzt



(E)

und anschliessend die gegebenenfalls vorhandene Doppelbindung oder chlorierte Doppelbindung katalytisch zu  $CH_2CH_2(CF_2)_nCF_3$  reduziert;

(d)  $R_3$  OH, F oder  $-(CF_2)_n-CF_3$  bedeutet, worin n für eine Zahl von 0 bis 7 steht,  
 dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung der Formel IVb

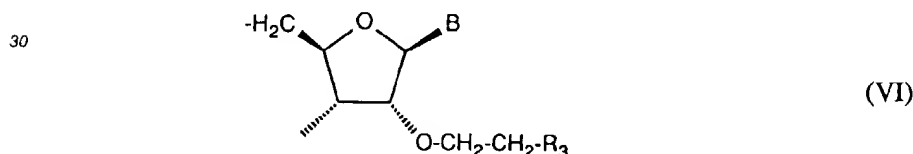


(IVb),

worin  $R_{14}$  und  $R_{15}$  die oben erwähnte Bedeutung haben und A für eine Abgangsgruppe steht, nach einem der in (a) bis (c) beschriebenen Verfahren an der 2'-OH Gruppe substituiert und den Basenrest B durch Substitution einführt; und gegebenenfalls die Schutzgruppen  $R_{14}$  und  $R_{15}$  abspaltet.

- 5 26. Verwendung der Verbindungen gemäss Anspruch 1 zur Herstellung von Oligonukleotiden, die gleiche oder verschiedene Monomereinheiten von Verbindungen der Formeln I oder die mindestens eine Monomereinheit von Verbindungen der Formeln I in Kombination mit Monomereinheiten von anderen natürlichen oder synthetischen Nukleosiden enthalten, wobei die Oligonukleotide aus 2 bis 200 Monomereinheiten bestehen.
- 10 27. Verwendung gemäss Anspruch 26 zur Herstellung von Oligonukleotiden mit 2 bis 100 Monomereinheiten.
28. Verwendung gemäss Anspruch 27 zur Herstellung von Oligonukleotiden mit 2 bis 50 Monomereinheiten.
- 15 29. Verwendung gemäss Anspruch 28 zur Herstellung von Oligonukleotiden mit 4 bis 30 Monomereinheiten.
30. Verwendung gemäss Anspruch 26 zur Herstellung von Oligonukleotiden mit gleichen oder verschiedenen Monomereinheiten von Verbindungen der Formeln I.
- 20 31. Verwendung gemäss Anspruch 26 zur Herstellung von Oligonukleotiden mit gleichen Monomereinheiten von Verbindungen der Formeln I und Monomereinheiten von natürlichen oder synthetischen Nukleosiden.

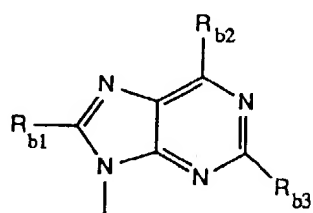
32. Oligonukleotide der Formel V
- $$5'-U-(O-Y-O-V)_x-O-Y-O-W-3' \quad (V),$$
- 25 worin x eine Zahl von 0 bis 200 und Y eine Nukleotid-Brückengruppe bedeuten; U, V und W je für sich gleiche oder verschiedene Reste von natürlichen oder synthetischen Nukleosiden darstellen und mindestens einer der Reste U, V und/oder W einen Rest der Formel VI bedeutet



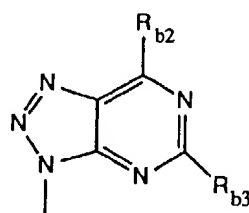
- 35 worin B einen Purin- oder Pyrimidinrest oder ein Analoges davon darstellt; und  $R_3$  für OH, F oder  $(CF_2)_nCF_3$  steht, worin n eine Zahl von 0 bis 7 bedeutet.

33. Oligonukleotide gemäss Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass n die Zahl 0 bedeutet.
- 40 34. Oligonukleotide gemäss Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Brückengruppe Y um  $-P(O)O^\ominus$ -,  $-P(O)S^\ominus$ -,  $-P(S)S^\ominus$ -,  $-P(O)R_{16}$ -,  $-P(O)NR_{17}R_{18}$ -, oder  $-CH_2$ - handelt, worin  $R_{16}$  H oder  $C_1$ - $C_6$ -Alkyl darstellt, und  $R_{17}$  und  $R_{18}$  unabhängig voneinander die Bedeutung von  $R_{16}$  haben.
- 45 35. Oligonukleotide gemäss Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass sich bei der Brückengruppe Y um  $-P(O)O^\ominus$ - handelt.
36. Oligonukleotide gemäss Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass x für eine Zahl von 0 bis 100 steht.
- 50 37. Oligonukleotide gemäss Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, dass x für eine Zahl von 1 bis 50 steht.
38. Oligonukleotide gemäss Anspruch 37, dadurch gekennzeichnet, dass x für eine Zahl von 3 bis 29 steht.
39. Oligonukleotide gemäss Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Reste der Formel VI endständig und/oder in der Nukleotidsequenz gebunden sind.
- 55 40. Oligonukleotide gemäss Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Reste der Formel VI zwischen Resten von natürlichen oder synthetischen Nukleosiden gebunden sind.

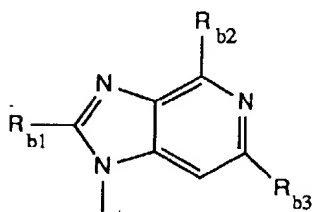
41. Oligonukleotide gemäss den Ansprüchen 39 und 40, dadurch gekennzeichnet, dass 2 bis 5 gleiche oder verschiedene Reste der Formel VI aufeinander folgen.
42. Oligonukleotide gemäss Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass insgesamt 4 bis 30 Nukleosideinheiten und 1 bis 12 Reste der Formel VI enthalten sind.
43. Oligonukleotide gemäss Anspruch 32, worin B als Purinrest oder einem Analogen davon einen Rest der Formeln II, IIa, IIb, IIc, IId, IIe oder IIIf darstellt,



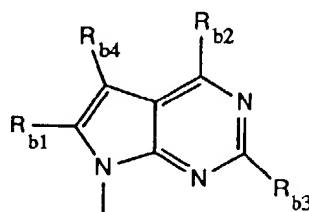
(II),



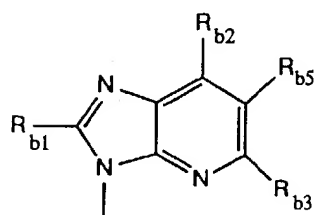
(IIa),



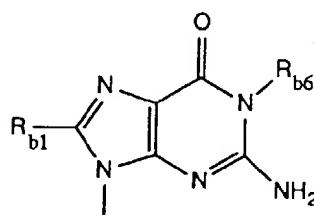
(IIb),



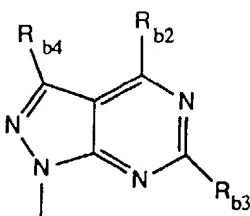
(IIc),



(IId),



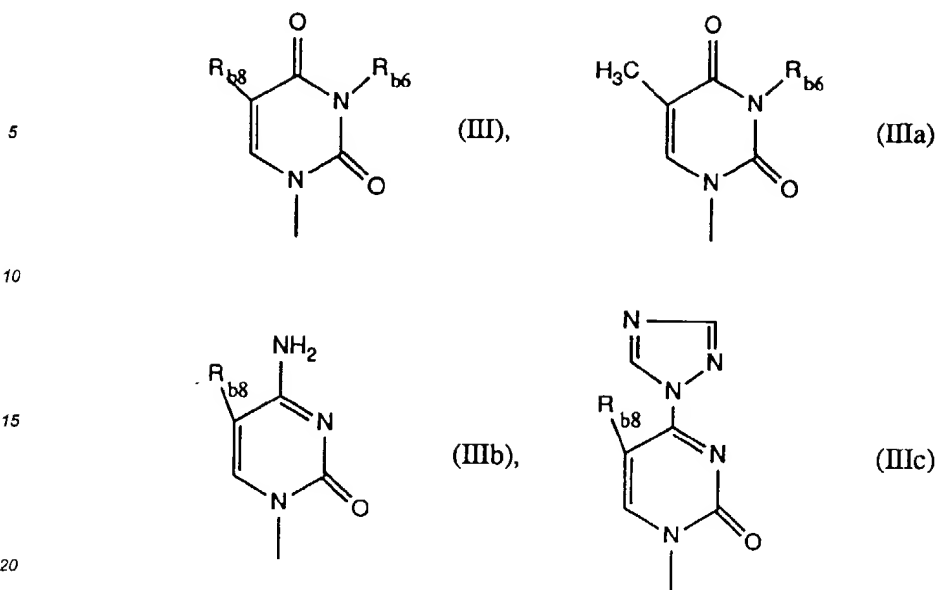
(IIe),



(IIIf),

worin  $R_{b1}$  für H, Cl, Br, OH oder  $-O-C_1-C_{12}$ -Alkyl steht, und  $R_{b2}$ ,  $R_{b3}$  und  $R_{b5}$  unabhängig voneinander H, OH, SH,  $NH_2$ ,  $NHNH_2$ ,  $NHOH$ ,  $NHO-C_1-C_{12}$ -Alkyl,  $-N=CH-N(C_1-C_{12}-Alkyl)_2$ ,  $-N=CH-N$ -Cycloalkyl, F, Cl, Br,  $C_1-C_{12}$ -Alkyl, Hydroxy- $C_1-C_{12}$ -alkyl, Amino- $C_1-C_{12}$ -alkyl,  $C_1-C_{12}$ -Alkoxy, Benzyloxy,  $C_1-C_{12}$ -Alkylthio, wobei die Hydroxyl- und Aminogruppen unsubstituiert oder mit einer Schutzgruppe substituiert sind, Phenyl, Benzyl, Primäramino mit 1 bis 20 C-Atomen oder Sekundäramino mit 2 bis 30 C-Atomen bedeuten,  $R_{b4}$  Wasserstoff, CN oder  $-C\equiv C-R_{b7}$ ,  $R_{b6}$  und  $R_{b7}$  Wasserstoff oder  $C_1-C_4$ -Alkyl darstellen.

44. Oligonukleotide gemäss Anspruch 32, worin B einen Uracil-, Thymin- oder Cytosinrest der Formel III, IIIa, IIIb oder IIIc darstellt,



25

30

worin  $R_{b6}$  H oder  $C_1$ - $C_4$ -Alkyl und  $R_{b8}$  H, OH, SH,  $NH_2$ ,  $NHNH_2$ ,  $NHOH$ ,  $NHO$ - $C_1$ - $C_{12}$ -Alkyl,  $-N=CH-N(C_1-C_{12}-Alkyl)_2$ ,  $-N=CH-N$ -Cycloalkyl, F, Cl, Br,  $C_1$ - $C_{12}$ -Alkyl, Hydroxy- $C_1$ - $C_{12}$ -alkyl, Amino- $C_1$ - $C_{12}$ -alkyl,  $C_1$ - $C_{12}$ -Alkoxy, Benzyloxy,  $C_1$ - $C_{12}$ -Alkylthio, wobei die Hydroxyl- und Aminogruppen unsubstituiert oder mit einer Schutzgruppe substituiert sind, Phenyl, Benzyl, Primäramino mit 1 bis 20 C-Atomen, Sekundäramino mit 2 bis 30 C-Atomen,  $C_1$ - $C_{12}$ -Alkenyl oder  $C_1$ - $C_{12}$ -Alkynyl bedeuten, und die  $NH_2$ -Gruppe in Formel IIIb unsubstituiert oder mit  $C_1$ - $C_6$ -Alkyl, Benzoyl oder einer Schutzgruppe substituiert ist, sowie die Dihydroderivate der Reste der Formeln III, IIIa, IIIb und IIIc.

- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
45. Oligonukleotide gemäss Anspruch 32, worin  $R_3$  OH bedeutet.
  46. Oligonukleotide gemäss Anspruch 32, worin  $R_3$  F bedeutet.
  47. Oligonukleotide gemäss Anspruch 32, worin  $R_3$   $(CF_2)_nCF_3$  bedeutet.
  48. Oligonukleotide gemäss Anspruch 32, worin n eine Zahl von 0 bis 3 bedeutet.
  49. Oligonukleotide gemäss Anspruch 48, worin n 0 bedeutet.
  50. Verwendung der Oligonukleotide der Formel V als Diagnostika zum Nachweis von viralen Infektionen oder genetisch bedingten Krankheiten.
  51. Oligonukleotide der Formel V zur Anwendung in einem therapeutischen Verfahren zur Behandlung von Krankheiten bei Warmblütern einschliesslich des Menschen durch Wechselwirkung mit Nukleotidsequenzen im Körper.
  52. Pharmazeutisches Präparat, enthaltend eine wirksame Menge eines Nukleosids der Formeln I oder eines Oligonukleotids der Formel V alleine oder zusammen mit anderen Wirkstoffen, ein pharmazeutisches Trägermaterial und gegebenenfalls Hilfsstoffe.



(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

**EP 0 679 657 A3**

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(84) Veröffentlichungstag A3:  
10.04.1996 Patentblatt 1996/15

(51) Int Cl.<sup>6</sup>: **C07H 19/067**, C07H 19/167,  
C07H 21/00, C12Q 1/68,  
A61K 31/70

(43) Veröffentlichungstag A2:  
02.11.1995 Patentblatt 1995/44

(21) Anmeldenummer: **95810259.2**

(22) Anmeldetag: **19.04.1995**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH DE DK ES FR GB IE IT LI LU NL PT SE**

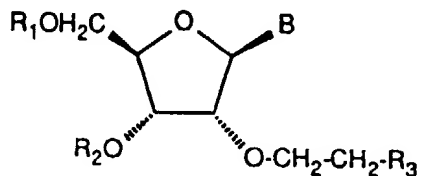
(71) Anmelder: **CIBA-GEIGY AG**  
**CH-4002 Basel (CH)**

(30) Priorität: **27.04.1994 CH 1307/94**

(72) Erfinder: **Martin, Pierre, Dr.**  
**CH-4310 Rheinfelden (CH)**

(54) **Nukleoside und Oligonukleotide mit 2'-Ethergruppen**

(57) Es werden Verbindungen der Formel



beschrieben, worin  $R_1$  und  $R_2$  unabhängig voneinander

für Wasserstoff oder eine Schutzgruppe stehen oder  $R_1$  diese Bedeutungen hat und  $R_2$  für einen eine phosphorhaltige Nukleotid-Brückengruppe bildenden Rest steht; B einen Purin- oder Pyrimidinrest oder ein Analoges davon bedeutet; und  $R_3$  für OH, F oder  $(CF_2)_nCF_3$  steht, worin n eine Zahl von 0 bis 7 bedeutet, und Oligonukleotide, die diese Nukleoside enthalten.



Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER TEILRECHERCHENBERICHT Nummer der Anmeldung

der nach Regel 45 des Europäischen Patent-  
übereinkommens für das weitere Verfahren als  
europäischer Recherchenbericht gilt

EP 95 81 0259

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
D,A	WO-A-91 06556 (GILEAD SCIENCES, INC.) 16.Mai 1991 * das ganze Dokument * ---	1,25,26, 32,50,52	C07H19/067 C07H19/167 C07H21/00 C12Q1/68 A61K31/70
A	TETRAHEDRON LETTERS, Bd. 34, Nr. 6, 1993 OXFORD GB, Seiten 1003-1006, B.C.FROEHLER ET AL. 'Oligonucleotides Derived from 5-(1-Propynyl)-2'-O-allyl-Uridine and 5-(1-Propynyl)-2'-O-Allyl-Cytidine : Synthesis and RNA Duplex Formation.' * das ganze Dokument * ---	1,25,26, 32	
A	BIOCHEMISTRY, Bd. 32, Nr. 30, 3.August 1993 EASTON, PA US, Seiten 7832-7838, E.A.LESNIK ET AL. 'Oligodeoxynucleotides Containing 2'-O-Modified Adenosine: Synthesis and Effects on Stability of DNA:RNA Duplexes.' * das ganze Dokument * ---	1,25,26, 32	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6)
			C07H C12Q A61K
UNVOLLSTÄNDIGE RECHERCHE			
<p>Nach Auffassung der Recherchenabteilung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung den Vorschriften des Europäischen Patentübereinkommens so wenig, daß es nicht möglich ist, auf der Grundlage einiger Patentansprüche sinnvolle Ermittlungen über den Stand der Technik durchzuführen.</p> <p>Vollständig recherchierte Patentansprüche: Unvollständig recherchierte Patentansprüche: Nicht recherchierte Patentansprüche: Grund für die Beschränkung der Recherche:</p> <p>Siehe Ergänzungsblatt C</p>			
Recherchemort		Abschlußdatum der Recherche	
DEN HAAG		26.Januar 1996	
		Prüfer	
		Scott, J	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN			
<p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur</p> <p>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument &amp; : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>			

## EUROPÄISCHER TEILRECHERCHENBERICHT

EPO FORM 1501 01.82 (P04C12)

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	
P,A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 122, no. 5, 30.Januar 1995 Columbus, Ohio, US; abstract no. 56416v, H.KATO ET AL. 'Preparation of O-haloalkyl Nucleosides and Nucleoside Derivatives Having Amino or Thiol Linkers.' Seite 1233; Spalte 2; * Zusammenfassung *	1,25,26, 32	
P,A	& JP-A-06 256 380 (TOA GOSEI CHEM. IND.) 13.September 1994 ---		
P,A	EP-A-0 626 387 (CIBA-GEIGY AG) * das ganze Dokument * -----	1-52	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6)



EP 95 81 0259

- C -

Bemerkung : Obwohl Ansprüche 50-51 sich auf ein Verfahren zur Behandlung der menschlichen/tierischen Körpers beziehen (Artikel 52(4) EPU), wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.